

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA MUTAGENICIDAD EN AGUAS DE BEBIDA POR MEDIO DEL
TEST DE MUTACION REVERSA EN *ESCHERICHIA coli*

TESIS DOCTORAL
M^a BELEN GRANADOS Y ARROYO
MADRID, 1993



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Medicina Preventiva y Salud Pública

D. MANUEL DOMINGUEZ CARMONA, Catedrático Emérito y DÑA. MARGARITA ROMERO MARTIN, Profesora Titular, ambos del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e Historia de la Ciencia, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR: Que DÑA. M^a BELEN GRANADOS Y ARROYO ha realizado su Tesis Doctoral titulada "Estudio de la mutagenicidad en aguas de bebida por medio de test de mutación reversa en Escherichia coli", bajo nuestra dirección.

Y para que así conste, lo firmamos en Madrid a día uno de Diciembre de mil novecientos noventa y tres.

Fdo.: M. Domínguez Carmona

Fdo.: M. Romero Martín

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La Memoria Académica que lleva por título "ESTUDIO DE LA MUTAGENICIDAD EN AGUAS DE BEBIDA POR MEDIO DEL TEST DE MUTACION REVERSA EN ESCHERICHIA COLI" presentada por D^a MARIA BELEN GRANADOS Y ARROYO, para la obtención del Título Académico de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Dicho trabajo cumple los requisitos del método científico y sus contenidos son adecuados a los objetivos planteados

V.º B.º
EL TUTOR (2)

Fdo.: M. Domínguez

El Director de la Tesis

M. Romero

Fdo.:

(fecha y firma)

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Reunida la Comisión de Doctorado del Departamento de MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PUBLICA E HISTORIA DE LA CIENCIA, y una vez examinados la metodología y contenidos del trabajo de investigación realizado por D^a MARIA BELEN GRANADOS Y ARROYO, acuerda admitir a trámite dicho trabajo.

Fecha reunión
Consejo Departamento

29 de Noviembre de 1.993

El Director del Departamento

Fdo.: DIEGO M. GRACIA GUILLEN

(fecha y firma)

A mi familia

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directores, Prof. Dr. D. Manuel Dominguez Carmona y Prof^a. Dra. Dña. Margarita Romero Martin.

Al Prof. Dr. D. Vicente Dominguez Rojas, por el apoyo moral y logístico que me ha brindado en todo momento.

A las Prof. Dras. Dña. Paloma Ortega Molina y Dña. Paloma Astasio Arbiza, por su paciencia e inestimable ayuda, sin las cuales no habría llegado a finalizar este trabajo.

A todos los compañeros de la Cátedra de Medicina Preventiva y Salud Pública, con especial mención a las Dras. Dña. Romana Albaladejo Vicente y Dña. Rosa Villanueva Orbaiz por su ayuda e interés.

A Dña. M^a Teresa Pollastrini Pérez-Mangado y Dña. Marta Barea Sánchez, del Area de Toxicología Ambiental del Instituto de Salud Carlos III, así como a Dña. M^a Luisa Beringola y a todo el personal de dicha sección, por su constante ayuda en todo momento desde el comienzo del trabajo, ya que sin sus orientaciones este trabajo difícilmente hubiera tenido un buen final.

A D. Jorge Sabariz Baeza por la ayuda que me prestó en el comienzo de este trabajo.

A mi familia que tanto me ha apoyado y estimulado en todo este tiempo transcurrido, y aún lo sigue haciendo.

Para finalizar, a todos aquéllos que de alguna forma han contribuído a la elaboración y finalización de este trabajo.

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
	1. Historia.....	4
	2. Características genéticas.....	5
	3. Mutaciones.....	6
	4. Mecanismos de acción de compuestos químicos mutágenos.....	7
	5. Carcinogénesis.....	8
	6. Mecanismos de carcinogénesis química.....	9
	6.1. Mecanismos genéticos.....	9
	6.2. Mecanismos Epigenéticos.....	13
	7. Base Molecular de la Reparación.....	14
	8. Evaluación de la Mutagenicidad de las sustancias químicas.....	15
	8.1. Observaciones en el hombre.....	15
	8.2. Ensayos a largo plazo en animales.....	16
	8.3. Tests de Mutagenicidad.....	18
	9. Validación de los tests de mutagenicidad.....	21
	10. Ensayo de Mutación Reversa en <i>Escherichia coli</i> ...	24
	11. Cloración de aguas de consumo público.....	27
	12. Compuestos orgánicos en aguas de bebida.....	28
	13. Concentración de las muestras.....	29
	13.1. La necesidad de concentrar.....	29
	13.2. Mutagenicidad asociada con la fracción ácida	31
	14. Fuentes de Genotoxicidad.....	32
	14.1. Contaminación de fuentes de agua.....	32
	14.2. Productos generados por la desinfección Trihalometanos	33
	15. Evidencia del Riesgo.....	37
	16. Estudio Epidemiológicos completos.....	38
	16.1. Estudios Ecológicos.....	38
	16.2. Estudios Caso-Control.....	39
II.	OBJETIVOS.....	42
III.	MATERIAL Y METODOS.....	44
	Fundamento del Método.....	45
	1. Material Biológico.....	46

1.1. Cepas Bacterianas.....	46
1.2. Fracción microsomal de hígado de rata.....	48
2. Métodos.....	50
2.1. Obtención y conservación de las cepas.....	50
2.2. Verificación de las características	
genotípicas.....	50
2.3. Obtención del cultivo en fase estacionaria..	54
2.4. Ensayo de Mutagenicidad.....	55
2.5. Controles de esterilidad en ensayos	
de reversión con <i>Escherichia coli</i>	58
3. Material de Laboratorio.....	59
3.1. Reactivos y Soluciones.....	59
3.2. Medios.....	61
3.3. Material e instrumentos de Laboratorio.....	62
4. Muestras de agua.....	63
4.1. Preensayo.....	63
4.2. Preparación de las muestras.....	66
5. Cuantificación del Efecto mutagénico.....	70
5.1. Método basado en el cálculo	
del Índice de Mutación.....	70
5.2. Método estadístico basado en el	
Análisis de la Varianza.....	71
IV. RESULTADOS.....	72
1. Resultados del Preensayo.....	73
1.1. Determinación del cloro libre residual.....	73
1.2. Determinación de la cantidad	
de materia orgánica.....	76
2. Resultados del Ensayo.....	79
2.1. Cepa WP2.....	81
2.2. Cepa WP2 <i>uvrA</i>	85
2.3. Cepa WP2 <i>uvrA pKM101</i>	89
3. Resumen de la Evaluación Mutagénica.....	95
V. DISCUSION.....	119
1. Clasificación de los Tests de Mutagenicidad....	120
1.1. Aplicaciones de los Tests de	
Mutagenicidad.....	122
1.2. Validación de los Tests de	
Mutagenicidad.....	123

1.3. Características de los Tests empleados en nuestro estudio	127
2. Métodos de Ensayo.....	136
2.1. Ensayo de Incorporación en placa.....	137
2.2. Ensayo de Preincubación en placa.....	138
2.3. Criterios para aceptar datos de mutagenicidad.....	140
2.4. Criterios para definir una respuesta positiva.....	141
3. Cuantificación del Efecto mutagénico.....	142
4. Mutagenicidad en aguas cloradas.....	146
4.1. Fuentes de mutágenos.....	147
4.2. Identificación de Compuestos genotóxicos..	148
4.3. Estudios "in vitro" e "in vivo".....	151
4.4. Asociaciones "in vivo".....	152
5. Análisis de los Resultados obtenidos.....	155
VI. CONCLUSIONES.....	158
VII. BIBLIOGRAFIA.....	160

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Durante los pasados 150 años se han producido cambios importantes en las causas de muerte en las sociedades occidentales. En particular, desde 1850 las mejoras en la Salud Pública han supuesto una disminución en el número de muertes por enfermedades infecciosas. Esta tendencia se demuestra actualmente por el hecho de que las enfermedades vasculares causan hoy día, en las sociedades industrializadas, 50 veces más muertes que las enfermedades infecciosas.

La epidemiología de las diferentes poblaciones y de los movimientos migratorios de un área a otra, sugieren que el cáncer es causado por influencias ambientales y que la prevención del mismo consiste en evitar dicha influencia, basándose en la identificación precisa de aquéllas que contribuyen a la alta incidencia de este proceso (1).

Los estudios epidemiológicos efectuados desde hace más de 20 años han llegado a la conclusión de que los procesos tumorales en el hombre se deben en muchas ocasiones a factores ambientales; aquí el término ambiente está tomado en el sentido de su más amplia acepción, englobando a la vez el ambiente socio-cultural, que determina nuestros modos de vida y nuestros comportamientos, y el ambiente físico-químico cuyas características están cada vez más alteradas por la actividad humana (2).

Los epidemiólogos estiman que al menos el 70% del cáncer humano en el mundo, en principio, podría evitarse si los principales factores de riesgo pudieran ser identificados. Esto puede explicarse si observamos la incidencia de diferentes tipos específicos de cáncer en ciertas partes del mundo donde la población tiene estilos de vida diferentes. Por ejemplo, el cáncer de colon y el de mama, los cuales están entre los tipos más importantes en Estados Unidos, son bastante raros entre los japoneses nativos, pero no entre los japoneses-americanos (3).

Las estimaciones de Doll y Peto, que son las más frecuentemente citadas en la literatura, indican que alrededor del 35% de las muertes por cáncer se deberían a los hábitos alimenticios, el 10% al comportamiento sexual y reproductor, el 3% al consumo excesivo de alcohol, el 2% a la contaminación del ambiente, otro 2% correspondería a factores ocupacionales, como por ejemplo el asbesto y el 1% o menos a los factores yatrógenos, aditivos alimenticios y productos industriales comercializados (3).

Durante las pasadas décadas, se han realizado grandes avances en la comprensión del proceso que conduce al desarrollo de tumoraciones malignas. Parece claro que las alteraciones del material genético están implicadas en esos procesos y que un gran número de compuestos carcinógenos son capaces de inducir dichas alteraciones bajo condiciones propicias (4).

Tradicionalmente la identificación de estos productos se ha llevado a cabo mediante estudios epidemiológicos y experimentales, a largo plazo, sobre la carcinogenicidad en animales. Ambos métodos son costosos y de larga duración, motivo por el cual se desarrollaron tests predictivos de carcinogenicidad cortos, económicos, pero sin embargo precisos (1).

1. HISTORIA

El desarrollo de tests predictivos de carcinogenicidad ha sido espectacular en los últimos años, y está basado en la información procedente de la investigación sobre el cáncer que comenzó a finales del siglo pasado.

La primera demostración de que los compuestos químicos podían inducir procesos tumorales en animales, fue la producción de cáncer de piel en conejos después de la aplicación repetida de carbón en forma de alquitrán (5). En los siguientes años se procedió al aislamiento de los componentes de esta sustancia. Pero hasta 1947 no se sugirió que algunas de estas sustancias químicas, relativamente inertes, requerían conversión

metabólica para convertirse en constituyentes activos (6).

Los trabajos realizados durante los siguientes 20 años confirmaron esta suposición. Finalmente, en 1969, fue posible demostrar que una gran proporción de carcinógenos químicos requerían conversión en metabolitos activos antes de que pudieran ejercer sus efectos cancerígenos (7).

La primera inducción química de mutación en sistemas experimentales fue demostrada en 1946 con *Drosophyla* (8). El conocimiento de la estructura del ADN y ARN permitió aclarar la comprensión de los mecanismos relacionados con la inducción de la mutación en sistemas experimentales.

A partir de 1969 aparecieron nuevas publicaciones acerca de que la activación *in vitro* de compuestos químicos en metabolitos mutagénicos, era capaz de producir efectos tóxicos o mutagénicos (9,10). Estas observaciones prepararon el terreno para el desarrollo por Ames y colaboradores de un test para detectar carcinógenos basado en un metabolismo *in vitro* y en la inducción de mutaciones en *Salmonella* (11,12,13).

2. CARACTERISTICAS GENETICAS

Las características de una célula u organismo pluricelular, vienen contenidas en su material genético, el cual está compuesto por el ácido desoxirribonucleico o ADN.

El hecho de que la estructura básica helicoidal del ADN y el código genético sea común a todos los organismos vivos, tanto bacterias como plantas o mamíferos, significa que los datos obtenidos de los efectos de un producto químico sobre una de éstas especies, puede ser usado como factor predictor de posibles respuestas genéticas en otras frente al mismo agente.

Por lo que se refiere a las bacterias, organismo central de nuestro estudio, son procariontes cuya composición química fundamental no difiere de la de las células de los eucariontes: lípidos, proteínas y los dos tipos de ácidos nucleicos (ADN y ARN), pero sin

embargo difieren en su estructura. En contraste con los eucariontes, los organismos procariontes, no tienen espacio genético definido, ya que carecen de membrana celular, pues únicamente constan de una pared celular rígida, dentro de la cual se encuentra una membrana que actúa de barrera de permeabilidad regulando la entrada de sustancias.

3. MUTACIONES

Los agentes químicos mutágenos pueden producir tanto cambios ocasionales de unas bases por otras, como su eliminación o el intercalamiento de bases en una secuencia dada, provocando lo que llamaremos **mutación**; mientras que el intercambio de información genética o de segmentos de ADN entre cromosomas diferentes, conduce a la **recombinación**.

Las alteraciones en la información que transporta el ADN suceden como resultado de pequeños cambios en la estructura de la molécula del mismo; de ésta forma, la secuencia que se transmite a la siguiente generación es diferente, dando como resultado descendientes cuyas características difieren de las de sus predecesores.

Estas alteraciones en el ADN, son mutaciones y, aunque algunas de ellas son letales, otras son compatibles con la vida, siendo responsable de las sutiles diferencias entre miembros de una misma especie y constituyendo el inicio de la evolución.

Dichos cambios en el ADN, pueden quedar anulados y restaurados eficazmente, pero el fallo en la reparación del mismo, puede conducir a la implantación de una secuencia de bases diferentes a la original durante el proceso de replicación (reparación postreplicación), lo que si bien permite dar continuidad física a la molécula, puede generar la producción de mutaciones. A éste último fenómeno se le da el nombre de **mutagénesis indirecta**, para distinguirlo de la que se produce por acción inmediata de un agente mutagénico sobre una molécula de ADN, o **mutagénesis directa**.

Los cancerígenos genotóxicos pueden dañar el material genético de las células germinales y de las somáticas.

Cuando las mutaciones implican cambios en la información genética que llevan las células germinales, la progenie de cada uno de los afectados puede expresar la mutación en forma de enfermedad o de anormalidad heredable. Las mutaciones a nivel de las células germinales dan lugar a cánceres muy poco frecuentes, como por ejemplo el retinoblastoma.

Si las mutaciones suceden en células somáticas, esto se traduce en cambios celulares irreversibles que pueden estar encubiertos y producir un crecimiento canceroso. Por tanto, las mutaciones que afectan a las células somáticas son responsables de la mayoría de los procesos tumorales malignos en el hombre (2).

4. MECANISMOS DE ACCION DE COMPUESTOS QUIMICOS MUTAGENOS

La acción de los mutágenos puede producir efectos en el ADN totalmente aleatorios y erráticos o bien pueden favorecer ciertos tipos de mutaciones (delecciones, sustituciones) o actuar directamente sobre determinadas regiones (sedes mutacionales) del ADN (14).

Los compuestos químicos mutágenos interactúan con el ADN causando cambios en su estructura produciendo cualquiera de las lesiones siguientes:

- El mutágeno no se incorpora al ADN pero altera una base, de manera que no se produce el apareamiento específico complementario; es el mecanismo de acción de muchos agentes alquilantes.
- El mutágeno se incorpora al ADN en el lugar de una de sus bases normales, induciendo errores en la replicación, a los que se denomina análogos de bases.
- Distorsionando las moléculas de ADN, por introducirse en ellas, causando consecuentemente pérdida o adición de bases; así actúan las acridinas, que son moléculas aromáticas.

- El mutágeno actúa como fuente intercalante, produciendo mutaciones de cambio de cuadro a lo que se denomina "frameshift" (15).

5. CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es un proceso dilatado en el tiempo, con múltiples estadios y diferentes factores que influyen sobre la progresión del normal funcionamiento celular hacia un tumor invasivo.

Un carcinógeno se define como el agente que aumenta significativamente la frecuencia de neoplasias malignas en la población.

Los carcinógenos pueden ser agentes físicos, químicos o biológicos.

Se pueden destacar tres tipos de carcinógenos según su mecanismo de acción, ya que algunos compuestos químicos de éste tipo no son considerados como carcinógenos completos, sino que son sólo responsables de una parte de procesos:

- **Iniciadores**, interactúan con el ADN comportándose como mutágenos que inician el proceso por el cual se induce la lesión primaria del mismo y el daño que causan generalmente es irreversible.
- **Promotores tumorales**, no son mutagénicos y únicamente muestran la influencia de la expresión y progresión del cambio inicial del ADN
- **Carcinógenos completos** y que son probablemente capaces de iniciar y promover actividad (2).

Todos los compuestos químicos que producen daño en el ADN y conducen a mutaciones o cáncer, incluyendo los iniciadores y los carcinógenos completos, son descritos como genotóxicos; éstos provocan daño en el genoma produciendo diferentes efectos: mutagénesis, carcinogénesis, muerte celular, inducción del fago, rotura del cromosoma, los cuales son todos irreversibles (16).

6. MECANISMOS DE LA CARCINOGENESIS QUIMICA

La carcinogénesis es un proceso biológico complejo que puede ocurrir por al menos dos mecanismos: genéticos o epigenéticos (17).

6.1 MECANISMOS GENETICOS

En los mecanismos genéticos, el cáncer tiene su origen en una alteración del material genético, es decir una mutación (acción genotóxica).

Los mecanismos genéticos probablemente son los responsables de la mayoría de los cánceres observados en el hombre, y derivan de un enlace covalente entre el carcinógeno y el ADN; ésta alteración produciría una mutación somática que daría lugar a la formación de un clon de células transformadas.

El mecanismo mutagénico de la carcinogénesis, también llamado "Teoría de la Mutación Somática en la Inducción del Cáncer", gira en torno a la interacción de químicos o formas activadas de químicos con el ADN.

Los tipos de daño genético se establecen en dos categorías básicas: mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas.

Los sistemas de mutagénesis bacteriana detectan sólo mutaciones genéticas; otros sistemas como los de la traslocación heredable detectan solamente aberraciones cromosómicas; algunos sistemas como el que se desarrolla en el díptero *Drosophila* son capaces de detectar ambos tipos de daño genético.

El mecanismo de la carcinogénesis implica un proceso de varios estadios, incluyendo iniciación (reacción con el ADN), promoción y finalmente progresión del tumor (18).

6.1.1 ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS

Las etapas citadas anteriormente son las que se describen a continuación:

A. Primera etapa

Llamada **iniciación**, comienza después de una mutación inducida por una sustancia cancerígena.

Los estudios en animales han demostrado que una sola administración de la sustancia puede ser suficiente para iniciar el cáncer. No obstante, la iniciación comienza definitivamente después de algunas divisiones celulares que dan nacimiento a varias células hijas, a partir de las cuales se puede desarrollar el cáncer (19).

Los mecanismos moleculares que conducen a la iniciación son relativamente complejos y pueden diferir de un cancerígeno a otro, ya que un mismo test reacciona con diferente precisión ante químicos de diferentes tipos (20).

La mayoría de las sustancias cancerígenas son de naturaleza orgánica. Estos cancerígenos orgánicos cuya estructura es extremadamente variable presentan una propiedad tóxico-cinética común: la de engendrar reactivos electrofílicos después de la activación metabólica. A partir de ésta consideración se pueden diferenciar dos tipos de cancerígenos:

Cancerígenos directos: Son directamente electrofílicos, por ejemplo, los agentes alquilantes, cromo, arsénico.

Precancerígenos: Se hacen electrofílicos después de la activación metabólica, por ejemplo las fibras de asbesto (21).

Para que haya iniciación, no es suficiente con que una sustancia electrófila reaccione con el ADN, sino que además es necesario que ésta interacción tenga lugar a nivel de genes muy específicos, siendo éste un fenómeno que explica en parte el carácter estocástico del cáncer.

Hasta hoy, se han identificado tres tipos de genes o secuencias del ADN como lugares posibles de iniciación:

- a) Proto-oncogenes, el cáncer puede iniciarse por una activación del proto-oncogen a través de una mutación puntual o más amplia (traslocación) que lo transforme en oncogen o gen inductor del cáncer.
- b) Anti-oncogenes o genes inhibidores de cáncer y
- c) Secuencias promotoras de la transcripción.

Las células iniciadas pueden permanecer durmientes durante numerosos años y, entre la iniciación y la aparición clínica del cáncer, puede transcurrir, como media, un período que se estima entre 15 y 20 años (2).

Según algunos autores (22) su potencialidad de crecimiento anárquico sería reprimida por mediadores provenientes de la vecindad celular.

B. Segunda etapa

Denominada **promoción**, corresponde a la expresión de la mutación a nivel de una célula iniciada. Esta célula sufre diversas modificaciones bioquímicas o morfológicas que producen su expansión clonal y la formación de un tumor benigno.

La experimentación animal ha demostrado que la promoción puede inducirse por la repetida administración de sustancias que se llaman promotoras.

Las promotoras, son sustancias desprovistas de actividad cancerígena intrínseca, pero que incrementan de manera considerable la formación de tumores después de la administración de un cancerígeno iniciador.

En realidad, la mayor parte de los cancerígenos son a la vez iniciadores y promotores y por tanto pueden inducir por si mismos el proceso de la carcinogénesis (2).

C. Tercera etapa

También denominada **progresión del tumor**, daría lugar a la aparición de las consiguientes metástasis.

6.2 MECANISMOS EPIGENETICOS

Los cánceres de origen epigenético, son el resultado de la interferencia del agente cancerígeno con los procesos que controlan la división y diferenciación celular pero sin modificaciones del material genético.

Es probable que la mayoría de los mecanismos epigenéticos descritos hasta hoy sólo puedan tener lugar en la experimentación animal, puesto que la dosis que requieren para su inducción es elevada y sin comparación posible con la exposición humana.

A continuación se citan los grupos de sustancias no genotóxicas que pueden inducir un cáncer en el animal expuesto de modo continuo, a dosis con frecuencia muy elevadas:

- Promotores, que favorecen la aparición de tumores debidos a mutaciones espontáneas, en ésta categoría se incluyen los pesticidas organoclorados (DDT), el fenobarbital o la dioxina.
- Sustancias cito-tóxicas como el tetracloruro de carbono, que puede producir un cáncer de hígado en la rata o la gasolina, que puede inducir un cáncer renal en la rata macho.
- Cancerígenos en estado sólido (algunas materias plásticas, asbesto).
- Irradiaciones (luz ultravioleta, radiaciones ionizantes).
- Sustancias que actúan por un mecanismo hormonal (por ejemplo amitrol, dietilestilbestrol).

La cuestión que ahora se plantea, es determinar si los cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos presentan riesgos comparables para el hombre.

Se obtuvo una respuesta a ésta cuestión comparando la genotoxicidad de las sustancias reconocidas como cancerígenas para el hombre (grupo 1 de la I.A.R.C.: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) (2) por medio de dos tests de mutagénesis, un test *in vivo* y un test *in vitro*, comprobándose que, con algunas excepciones, todos los productos cancerígenos para el hombre son positivos en, al menos, un test y que la mayor parte lo son en los dos tests. De ésta observación se deduce que las sustancias cancerígenas que representen riesgo para el hombre deben ser despistadas por uno test de mutagénesis adecuado.

7. BASE MOLECULAR DE LA REPARACION

Ante la agresión de un tóxico, la célula dispone de determinados mecanismos de reacción para intentar restaurar la secuencia del ADN dañada o perdida, los principales son:

- Inactivación metabólica de los reactivos electrófilos.
- Reparación por sustitución de la región lesionada, mediante el mecanismo de reparación por escisión.
- Reparación por cortocircuito de la lesión, mediante mecanismos de reparación post-replicación.
- Reparación *in situ*, mediante el mecanismo de acción enzimática de los daños causados en el ADN.
- Eliminación por el sistema inmunitario (linfocitos T citotóxicos) de las células cancerosas aberrantes. Numerosos tóxicos pueden, inhibiendo éste mecanismo, sensibilizar al organismo a los procesos cancerosos; pero a su vez pueden estimularse por diversas sustancias a las que algunos califican de anticancerosas, como las vitaminas A, C o E, el selenio o incluso algunos xenobióticos vegetales (2).

8. EVALUACION DE LA MUTAGENICIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUIMICAS

Para identificar las sustancias potencialmente cancerígenas en el hombre se pueden utilizar cuatro tipos de metodologías diferentes.

8.1 OBSERVACIONES EN EL HOMBRE

Generalmente es el método que mejor evalúa la carcinogenicidad de las sustancias químicas en el hombre, pero los estudios epidemiológicos sobre el cáncer encuentran numerosas dificultades, de las que podemos comentar las siguientes:

- Se trata de estudios que no son concluyentes, ya que debido al largo período de latencia del proceso tumoral, la exposición al agente causal puede haberse iniciado del orden de 20 a 30 años antes.
- En ocasiones, la exposición anterior es múltiple y está mal caracterizada, lo que complica la identificación de la sustancia cancerígena. En este sentido el tabaco y la alimentación son importantes factores de confusión.
- Por último, con frecuencia, el número de sujetos es limitado.

Está claro que, con tantas contrariedades, los estudios epidemiológicos sobre el cáncer, no sean capaces de identificar todas las sustancias cancerígenas para el hombre, estando por tanto su número subestimado (2).

8.2 ENSAYOS A LARGO PLAZO EN ANIMALES

Actualmente los ensayos de carcinogenicidad a largo plazo se efectúan en laboratorios especializados, utilizando animales de experimentación según un protocolo bien estructurado que se puede definir de la siguiente forma:

- a) Se deben utilizar al menos dos especies animales, por regla general se eligen ratas y ratones, lo que permite satisfacer el criterio de, al menos, 50 animales machos y hembras por dosis.
- b) El tratamiento debe incluir, al menos, 3 dosis de más en el grupo control. Con el fin de obtener el máximo de sensibilidad, se eligen dosis elevadas.
- c) Los animales están expuestos en general hasta los dos años de edad y, al término de la experiencia, los animales supervivientes son sacrificados para un examen histopatológico completo.

Actualmente, 800 sustancias se han probado según éste tipo de protocolo y el 65 % se han mostrado cancerígenas para una especie al menos (23).

Esta tasa muy elevada de cancerígenos se debe, por una parte, al hecho de que las sustancias sospechosas de producir carcinogenicidad son las que se prueban prioritariamente y, por otra parte, a la utilización de dosis muy elevadas dictadas por el criterio de sensibilidad.

Los ensayos de carcinogenicidad en animales son capaces de detectar los iniciadores y los promotores, así como los carcinógenos epigenéticos.

Estos estudios, según el protocolo anterior, presentan algunos límites:

- La administración de dosis elevadas produce la saturación de las vías de inactivación y de reparación del organismo y favorece los mecanismos epigenéticos, lo que inevitablemente lleva a una superestimación del número de sustancias potencialmente cancerígenas para el hombre.
- La extrapolación al hombre de los datos obtenidos en la experimentación animal ha de hacerse con cautela (23) y además hemos de tener presente que la mayoría de los estudios en animales se realizan con dosis superiores a las que el hombre puede estar expuesto.

- Este tipo de ensayos presentan el inconveniente de ser largos y costosos. Desde la planificación del estudio hasta la publicación del informe pasan con frecuencia más de cinco años y el coste total del estudio supera ampliamente el millón de dólares americanos.

8.3 TESTS DE MUTAGENICIDAD

Numerosos productos químicos, incluyendo derivados farmacéuticos, conservantes alimenticios, productos de limpieza, industriales, etc... están presentes en el ambiente.

Cada año se introducen un elevado número de sustancias nuevas, cuyo uso, en ocasiones, es indiscriminado, a pesar de desconocerse sus posibles efectos perjudiciales sobre la salud.

En ocasiones, se trata de compuestos que se generan de manera natural, y de los cuales se sabe que son potenciales carcinógenos y/o mutágenos.

Todo ello ha conducido al desarrollo en las últimas décadas de numerosos *ensayos rápidos o estudios a corto tiempo*, como procedimiento alternativo para la detección de compuestos químicos con poder potencial de carcinógenos, llamados así, ya que ofrecen resultados en días o semanas, y son baratos en cuanto a recursos puesto que utilizan sistemas biológicos en lugar de mamíferos completos.

Entre las ventajas más destacables a la hora de utilizar éstos tipos de tests se mencionan las siguientes:

- a) Algunos tests de mutagenicidad son capaces de detectar las reacciones de determinados productos químicos con el ADN, lo cual da como resultado mutaciones somáticas. Consecuentemente, éstos estudios de mutagenicidad serían teóricamente capaces de detectar carcinógenos iniciadores, sin embargo no serían capaces de descubrir sustancias promotoras ó carcinógenos epigenéticos.
- b) Además de mutaciones puntuales, ciertos tests de mutagenicidad detectan otros tipos de daño genético incluyendo alteraciones cromosómicas, mutaciones múltiples

específicas de locus y recombinaciones.

- c) Estudian las sustancias potencialmente cancerígenas para el hombre investigando las alteraciones que pudieran inducir en el material genético bacteriano o de células de mamíferos.
- d) A diferencia de organismos más especializados, en los cuales el ADN está organizado en complejas estructuras cromosómicas, las bacterias contienen una cadena sencilla de ADN circular, que es realmente accesible a los agentes químicos que pueden atravesar la pared celular.
- e) Los tests bacterianos tienen además la ventaja de que en un simple ensayo pueden estudiarse distintas generaciones de una población de varios millones de células (24).

Dentro de ellos el más conocido y utilizado es el test de mutagénesis sobre *Salmonella* desarrollado por Ames en 1971 (12). Una prueba alternativa de similares características utiliza una cepa de *Escherichia coli* la cual fue desarrollada por Moreau et al. (25) en el Instituto Pasteur.

8.3.1 MUTAGENESIS IN VITRO

Como señala Smith (26), en la última década la mutagénesis *in vitro* ha llegado a ser una de las herramientas más poderosas del análisis genético.

Su poder radica en la capacidad de cambiar, mediante manipulación química o enzimática, una secuencia específica del ADN de forma definida y predeterminada; es decir, se trata de inducir *in vitro* una mutagénesis dirigida cuyo objetivo, es establecer la relación entre el cambio genético inducido y el cambio en la expresión génica o su control o el cambio en las propiedades de los productos génicos.

Los avances en la tecnología molecular han permitido desarrollar métodos para construir mutantes *in vitro* (mutagénesis *in vitro*), modificando el ADN de secuencia

conocida y reintegrando dicho ADN en el organismo.

Los principales procedimientos de inducción de mutagénesis *in vitro* se pueden incluir en cuatro amplias categorías:

- *Reestructuración de fragmentos de ADN*: induciendo deleciones o añadiendo secuencias cortas.
- *Mutagénesis al azar localizada*: sobre una sede o región concreta del ADN.
- *Mutagénesis inducida por oligonucleótidos*: implica la síntesis de un oligonucleótido mutante y su utilización como cebador para la síntesis de una segunda cadena de ADN; si el ADN es bicatenario, se sintetizan dos oligonucleótidos complementarios y se mezclan con la molécula grande abierta (plasmidio, virus) para que se integre en ella.
- *Reemplazamiento de alelos*, se basa en inducir una mutación en una pequeña porción del genoma del organismo, utilizando las enzimas celulares para transferir dicha mutación.

Entre los inconvenientes de éste tipo de estudios destacan:

- a. Los sistemas *in vitro* no mimetizan exactamente los resultados en animales.
- b. Además, algunos químicos no son mutagénicos ó carcinogénicos en si mismos, sino que se trata de sustancias promutágenas o procarcinógenas, las cuales deben ser activadas por sistemas enzimáticos presentes en los organismos huéspedes.

9. VALIDACION DE LOS TESTS BACTERIANOS

Antes de emplearse los tests a corto tiempo como ensayos para determinar la posible capacidad mutagénica de ciertas sustancias, se valoró su sensibilidad y precisión para de éste modo comprobar el grado de confianza cuando fueran usados con fines determinativos.

Aunque hay descritos en la literatura más de un centenar de tests para investigar la genotoxicidad de una sustancia, menos de 20 tienen un uso regular e incluso algunos de ellos sólo están disponibles en laboratorios especializados.

Los ensayos que preconizan el uso de una bacteria para detectar mutágenos químicos, son los más ampliamente usados y en general los más profundamente validados.

La más extensa validación de los estudios bacterianos a corto tiempo fue realizada por Ames y colaboradores (27,28), quienes llevaron a cabo un estudio en el que se incluyeron más de 300 productos químicos; en el cual cerca del 90% de los carcinógenos resultaron ser mutágenos para la bacteria, y dentro de los no carcinógenos, el 90% mostraron actividad mutagénica.

Siguiendo éste modelo, Purchase et al (29) seleccionaron cuidadosamente 120 productos químicos y los investigaron en una serie de seis tests rápidos, obteniendo resultados similares a los del estudio anterior.

Rinkus y Legator (30) y Taylor (20), revisaron los datos de diversos tests bacterianos realizados sobre 465 carcinógenos conocidos o sospechados.

Los compuestos se dividieron según su estructura química en categorías separadas. Los químicos que mostraron la mejor correlación (94%) entre actividad mutagénica y carcinogénica fueron aquellos que reaccionaban directamente con el ADN, o que podían ser activados por enzimas metabólicas reactivas con el ADN.

Los compuestos químicos que por su estructura no eran adecuados para reaccionar con el ADN, mostraron una pobre relación entre actividad carcinogénica y mutagenicidad; éstas últimas sustancias producirían cáncer por un mecanismo diferente, posiblemente no genotóxico.

En España, Laborda et al. (31) han realizado a su vez una evaluación de la carcinogenicidad y mutagenicidad de 99 plaguicidas, obteniendo una sensibilidad del 51%

y una especificidad del 67%, con un 49% de falsos negativos y 33% de falsos positivos.

El más ambicioso ejercicio de validación realizado hasta la fecha ha sido el Programa Internacional para la Evaluación de Tests de Mutagenicidad a corto tiempo (32), en el que participaron más de 50 laboratorios y en el cual se evaluaron unos 30 ensayos *in vivo* e *in vitro*, con el fin de determinar su capacidad para discriminar entre compuestos carcinógenos y no carcinógenos.

Después de ser investigados cerca de 25 carcinógenos y 17 no carcinógenos, incluyendo 14 pares de carcinógenos/no carcinógenos, se llegó a la conclusión de que los ensayos de mutación bacteriana dan en conjunto un alto grado de confianza proporcionando resultados fidedignos en un gran número de laboratorios, y se han confirmado como la primera opción a la hora de iniciar un estudio de evaluación de un producto.

Un estudio colaborativo de mayores dimensiones que el de de Serres y Ashby, fue conducido bajo los auspicios del Programa Internacional en Seguridad Química.

El objeto de éste proyecto era identificar el o los mejores tests *in vitro* para complementar el ensayo de activación bacteriana (33).

Aunque los ensayos de mutación bacteriana tienen un alto valor predictivo para la carcinogenicidad, en muchos estudios de validación al menos el 10% dieron resultados discordantes con los datos obtenidos de cáncer en animales. Por ésta razón, es aceptado de manera general que los ensayos bacterianos no deberían ser usados de forma aislada para el análisis de productos químicos, recomendándose el uso de una batería de ensayos a corto tiempo como estudio preliminar.

Algunas autoridades como la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), la Comunidad Económica Europea (CEE) y la Agencia Americana para la Protección del Medio Ambiente (US EPA), emplean tests específicos para ser llevados a cabo en ciertos compuestos químicos.

10. ENSAYO DE MUTACION REVERSA EN *ESCHERICHIA COLI*

El ensayo se basa en la capacidad que tienen ciertos productos químicos de provocar mutaciones bacterianas.

El sistema fue descrito inicialmente por Bridges y las bacterias utilizadas son cepas de *Escherichia coli* portadoras de una mutación triptófano-dependiente (trp^-), que le impide fabricar uno de los enzimas requeridos para la síntesis del aminoácido triptófano (componente esencial de las proteínas). A consecuencia de ésta mutación, la bacteria no puede crecer en un medio nutritivo mineral a menos que el medio sea complementado con una fuente externa de triptófano.

En algunas ocasiones, la mutación trp^- sufre una reversión, es decir una mutación reversa restaura la secuencia normal en el código del ADN para el enzima requerido, y con ello devuelve el suministro interno de triptófano.

La reversión se descubre ya que sólo aquellas bacterias que la sufren, pueden formar colonias en un medio sin triptófano.

De ésta manera, la tasa de mutación reversa, normalmente muy baja, se incrementa considerablemente si la bacteria trp^- está expuesta a un producto que provoque mutación.

Los mutantes triptófano-independientes llamados revertantes, pueden aumentar a causa de un cambio de base en el lugar de la alteración original o por un cambio de base en cualquier sitio del cromosoma, como indican Bridges (34) y Osborn et al. (35).

Es pues un ensayo microbiano que permite medir la reversión trp^- a trp^+ , inducida por los productos químicos que provocan sustitución de base en el genoma del organismo o como se define en las directrices de la OECD (36) para los ensayos de productos químicos: "un ensayo de mutación reversa sobre *Escherichia coli*, detecta las mutaciones que tienen lugar en un gen de una cepa bacteriana trp -dependiente para producir una cepa trp -independiente".

Las bacterias se exponen a las sustancias de ensayo con y sin activación metabólica. Después de un período de incubación adecuado en un medio mínimo, se cuentan las colonias revertidas y se compara con el número de las revertidas espontáneamente, observadas en un cultivo testigo, no tratado y/o en presencia del disolvente utilizado.

Las cepas derivadas de la cepa WP2 son deficientes en diferentes procesos de reparación del ADN de tal manera que pueden tener según Witkin (37) las siguientes características:

- Mostrar creciente mutabilidad si el sistema de reparación perdido pudiera normalmente eliminar la parte dañada de la molécula de ADN, reparándola posteriormente de forma adecuada.
- Mostrar mutabilidad reducida si el proceso reparador es necesario para la conversión del daño de ADN en una secuencia final de bases mutadas.

Este mismo autor indica que ambos tipos son muy útiles, el primero porque dosis más bajas pueden ser utilizadas para obtener el mismo efecto mutagénico, y el segundo porque es más sensible a los agentes que dañan el ADN.

Indica asimismo que la principal desventaja, es que no detecta agentes que causan específicamente mutaciones de pares de bases "frameshift".

Esta desventaja, pudo ser en parte obviada cuando posteriormente se utilizaron cepas que contenían el plásmido pKM 101, según Clarke y Wade (38), pero no cabe duda que éste mismo sistema empleado por Ames para las cepas TA 100 y TA 1535 es considerado de más fiabilidad.

Este ensayo ha tenido diversas modificaciones y evoluciones entre las que merecen citarse la de Green y Muriel (39) y las de Brusick et al. (40) de las que parten los protocolos estandarizados de organismos internacionales actualmente en vigor.

Igualmente, Rossman y Klein (40) y Little et al. (42) realizan una revisión de éste ensayo tratando de buscar una correlación del mismo, con respecto al efecto genotóxico encontrado en ensayos con células de mamífero.

Las ventajas de éste método es que es rápido, de bajo costo y se obtienen medidas de un suceso genético específico. Analiza sustancias que no pueden ser evaluadas con *Salmonella tiphymurium*; por ello se utiliza junto al test de Ames como preensayo en carcinogénesis dentro del primer nivel de estudios.

En cuanto a los inconvenientes, tiene las limitaciones siguientes:

- Utiliza un organismo procariota, lo que complica las extrapolaciones al hombre
- No detecta algunos tipos de carcinógenos químicos
- Requiere un sistema exógeno de activación metabólica
- Indica solamente actividad mutagénica intrínseca y no puede ser utilizado para la estimación del riesgo humano
- Exclusivamente detecta mutaciones puntuales, no traslocaciones
- Tiene menos bases de datos que Salmonella, ya que su empleo ha sido menor

11. CLORACION DE AGUAS DE CONSUMO PUBLICO

La aplicación de la filtración al agua de bebida desde finales del siglo XVII y el uso de la cloración desde comienzos del siglo XX, han reducido notablemente la incidencia de enfermedades epidémicas transmitidas por el agua.

La seguridad y fiabilidad en el suministro del agua de bebida siguen dependiendo hoy día de la filtración y la cloración (43).

Con la llegada de la tecnología analítica moderna y de nuevos tests toxicológicos, se ha creado un nuevo concepto en materia de sanidad ambiental; esto es, diversos análisis químicos han puesto de manifiesto la presencia de productos derivados de la cloración del agua de bebida que han demostrado ser carcinógenos en animales (44).

11.1 COMPUESTOS ORGANICOS EN AGUA DE BEBIDA

Con respecto a la aparición de posibles efectos adversos sobre la salud por la acción de determinados cancerígenos ambientales, se ha intentado en los últimos años aumentar la concienciación sobre los mismos, así como la introducción de mejoras en la tecnología analítica aplicada (45).

En décadas pasadas, estudios procedentes de ciudades de diversas partes del mundo han documentado la amplia presencia de actividad genotóxica en concentrados orgánicos de agua de bebida (46).

La concentración por medio de filtros de carbón desarrollada por Middleton et al. (47), condujo a la aparición de los tests de Hueper y Payne (48), quienes a comienzos de 1963 sugirieron que existía carcinogénesis debida a sustancias orgánicas presentes en agua de bebida.

Asimismo, la identificación de carcinógenos químicos en el bajo Mississippi por la US EPA (49), atrajo la atención de Harris y Breecher en ese mismo año para confirmar las investigaciones en éste sentido.

Cerca de 500 compuestos han sido definitivamente identificados y la lista sigue aumentando (50, 51).

Paralelamente otros estudios epidemiológicos sugirieron una posible relación entre la incidencia de cáncer y la contaminación del agua de bebida: DeRouen y Diem (52), Page et al. (53), Cantor y McCabe (54), Wilkins et al. (55).

Aunque los daños ocasionados sobre fuentes de aguas de bebida por contaminantes de tipo industrial, agrícola y municipal contribuyen a la presencia de genotoxinas en las mismas, es el tratamiento del agua a través de la cloración el responsable primario de la aparición de mutágenos en agua de consumo humano, ya que el proceso en si mismo genera compuestos sintéticos contaminantes (56, 46); es decir, la práctica de la cloración ha resultado ser responsable de la formación de compuestos mutagénicos (57, 58).

De lo anteriormente expuesto se deduce que la actividad mutagénica será detectable en concentrados orgánicos de muchas aguas de bebida tratadas, en las cuales se usa el cloro como desinfectante (46).

Idealmente la evaluación de la genotoxicidad del agua de bebida sería realizada por el análisis directo de muestras de la misma.

Esto evitaría algunas cuestiones acerca de la alteración de los constituyentes de la mezcla durante el aislamiento o concentración de compuestos orgánicos en las muestras.

Debido a los problemas de debilidad, variabilidad y respuestas de falsos positivos cuando se analizan muestras de agua sin concentrar, y debido a la baja probabilidad de detectar mutágenos, incluso si éstos se presentan en concentraciones elevadas en la muestra, debe emplearse algún método de aislamiento y concentración de productos orgánicos antes de proceder al análisis de la posible genotoxicidad del agua de bebida estudiada.

Una descripción de los métodos disponibles y de las ventajas e inconvenientes de cada uno ha sido revisada por Kopfler (59) y Jolley (60).

Un punto importante en la revisión realizada por Wilcox et al. (61), es el que se refiere a la dificultad de hacer comparaciones significativas de resultados procedentes de estudios de diferentes muestras de agua, cuando las técnicas de concentración son variadas.

Las diferencias en los tipos o niveles de actividad genotóxica, pueden deberse más a un reflejo de los tipos de compuestos recuperados por un método de concentración dado, que a las diferencias reales en la composición de las muestras examinadas.

Debido a que todos los métodos de concentración son selectivos para los tipos de compuestos recuperados, es poco probable que exista un método simple que sea óptimo para la detección de compuestos genotóxicos en todas las aguas. Esto es particularmente probable en casos donde la actividad genotóxica resulta de un problema de contaminación específica de lugar (por ejemplo, descargas industriales con impacto sobre la calidad del agua de bebida).

La situación del agua de bebida puede diferir en cuanto a que la mutagenicidad en algunas de ellas puede atribuirse principalmente, sino enteramente, a la cloración del agua.

Este hecho sugiere que podría seleccionarse un método de concentración de muestras de agua, el cual fuera dirigido específicamente a la recuperación de compuestos mutagénicos producidos durante la cloración.

En éste sentido se está usando cada vez más extensamente un método de concentración basado en la utilización de cartuchos Sep-Pak[®] C₁₈, como procedimiento de análisis de mutágenos en agua de bebida.

La comparación con el método XAD-2 de concentración, mostró que el Sep-Pak absorbía 5 veces más cantidad de compuestos orgánicos (62).

11.2 MUTAGENICIDAD ASOCIADA CON LA FRACCION ACIDA

Recientemente varios estudios han informado acerca de una mayor actividad genotóxica de los extractos obtenidos a pH ácido que de aquellos obtenidos a pH neutro o con valores cercanos al neutro (63, 64, 65, 66, 67).

Monarca et al. (64), también han demostrado una actividad mutagénica sustancialmente mayor en la fracción ácida comparada con la neutra en agua de bebida en Noruega.

El origen de los mutágenos orgánicos ácidos en agua de bebida ha sido sugerido por los hallazgos de Kronberg et al. (66) y Meier et al. (67).

Estos autores han demostrado que la fracción responsable de mutagenicidad presente en soluciones ácidas húmicas cloradas está asociada con la fracción ácida.

Kronberg et al. (66) llevaron a cabo un estudio para comparar la actividad mutagénica asociada con las fracciones ácida y neutra, en aguas de bebida procedentes de tres ciudades de Finlandia, y también procedentes de aguas húmicas cloradas.

La respuesta mutagénica de los concentrados ácidos resultó ser 10 veces mayor que aquella para los concentrados neutros, tanto en el caso de aguas de bebida como en el de aguas húmicas cloradas.

12. FUENTES DE GENOTOXICIDAD

En los últimos años, han aparecido numerosos informes en la literatura especializada documentando la presencia de actividad genotóxica en concentrados orgánicos de agua de bebida.

Las fuentes de contaminantes genotóxicos en agua de consumo humano pueden ser clasificadas generalmente en tres grupos:

- . Contaminantes del agua como materia prima en bruto
- . Compuestos químicos añadidos o formados durante el tratamiento del agua
- . Compuestos químicos formados o añadidos al azar en el sistema de distribución

12.1 CONTAMINACION DE FUENTES DE AGUA

La contaminación de los abastecimientos de agua que se utilizan para el consumo de una comunidad, han sido objeto de diversos estudios (68).

La presencia de genotoxinas en fuentes de agua de bebida ha sido avalada tanto por la detección de efectos citogenéticos directos observados en especies acuáticas (69), como por la demostración de actividad genotóxica en concentrados orgánicos de estas aguas (70, 71).

Ha sido difícil determinar con precisión la fuente de contaminación genotóxica en la superficie de abastecimiento de agua, pero se han implicado como posibles orígenes descargas industriales y agrícolas, así como efluentes procedentes de las plantas de tratamiento municipal de aguas residuales.

En los últimos años, ha recibido una atención especial la contaminación de fuentes de agua profundas, como resultado del arrastre por parte del agua de compuestos químicos orgánicos sintéticos procedentes de vertederos residuales (72).

Los pesticidas agrícolas con actividad genotóxica también se consideran fuentes de contaminación del agua (73).

12.2 PRODUCTOS GENERADOS POR LA DESINFECCION: TRIHALOMETANOS

Actualmente el problema de la contaminación orgánica del agua de bebida ha cambiado considerablemente debido al conocimiento sobre ciertos productos. Se trata de contaminantes orgánicos de carácter halogenado que se generan como resultado de la desinfección del agua con cloro.

Esta circunstancia fue definida a comienzos de 1970, cuando la Agencia Americana de Protección del Medio Ambiente (US EPA) (49) advirtió que ciertos compuestos presentes en el agua potable eran sospechosos de ser carcinógenos para el hombre.

Concretamente se descubrió que la cloración del agua de bebida producía a veces cloroformo, un carcinógeno demostrado en animales que aumentaba la incidencia de carcinomas, tanto de pulmón como hepatocelulares y tumores epiteliales renales al administrarlo a altas dosis a ratas y ratones (74, 53).

Como consecuencia de la exposición anterior, US EPA creó un programa sobre agua de consumo que culminó con la publicación del Decreto de Seguridad en Aguas de Bebida (SDWA) de 1974 (44).

El uso del cloro como desinfectante genera ciertos compuestos orgánicos clorados (75) en el agua potable, al reaccionar el cloro libre en la planta de tratamiento con determinados "precursores" existentes en el agua, produciendo un grupo de compuestos de carbono simple y halógeno sustituido que se conocen como trihalometanos totales (THMs) (56, 76).

Los resultados aportados por US EPA revelaron la amplia presencia de THMs en abastecimientos de aguas de bebida desinfectadas con cloro (76, 77).

Estas sustancias incluyen carcinógenos humanos sospechosos del tipo del cloroformo, el bromodiclorometano, el clorodibromometano y el bromoformo (78).

En Noviembre de 1979, US EPA estimó provisionalmente un nivel máximo de contaminación (MCL) por THMs de 0.10 miligramos/l, como término medio anual (79).

Posteriormente, se estableció este nivel de forma definitiva al demostrarse claramente en Países Bajos y Estados Unidos que los THMs se forman cuando se cloran ciertas fuentes de agua (56, 76).

En España los parámetros de calidad del agua potable de consumo público, vienen recogidos en el Real Decreto 1138/1990 de 14 de Septiembre de 1990 (80), donde se detalla la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables de consumo público.

La formación de los THMs en aguas de bebida depende de la presencia y concentración de los precursores, la dosis de cloro y el tiempo de contacto, la temperatura del agua y el pH (81).

En la mayoría de casos, los THMs se producen, sobre todo en aguas de superficie cloradas, pero en algunas zonas, las aguas subterráneas son capaces de producir niveles altos. Dado que los precursores importantes que reaccionan con el cloro libre para producir los THMs se encuentran normalmente en las sustancias acuáticas húmicas (82), indudablemente los THMs han estado presentes en el suministro del agua siempre que se haya utilizado el cloro como desinfectante.

Además de los THMs, se ha demostrado que hay una variedad de productos orgánicos, tanto clorados como no clorados, que se forman como resultado de la cloración; entre ellos destacan varios ácidos clorados, alcoholes, aldehídos y cetonas, pero la información disponible acerca de los efectos sobre la salud de éstas sustancias es limitada (83, 84, 85).

12.2.1 Sustancias Húmicas

La mayor parte de la materia orgánica que está presente en la superficie del agua se debe a la existencia de forma natural de una cantidad de ácidos húmicos y fúlvicos sin definir, cuyo peso molecular oscila entre un rango de 15000 a 20000 daltons (86).

Las sustancias húmicas forman la mayor parte de la materia orgánica disuelta en lagos (87), ríos (88) y algunas aguas profundas (89), las cuales constituyen un 30-50% del carbón orgánico disuelto en agua (90).

La fracción ácida fúlvica constituye la mayor parte de las sustancias húmicas acuáticas (88).

Estos materiales orgánicos naturales presentes en el agua, han recibido una atención considerable como precursores de los productos generados por la desinfección, a partir del

descubrimiento de la presencia de trihalometanos en agua de bebida (76, 56), y de la propuesta de Rook según la cual los THMs se producían durante el tratamiento del agua, por la reacción del cloro con las sustancias húmicas (91).

Estudios posteriores (56, 92, 85, 93) confirmaron subsecuentemente que la cloración de ácidos húmicos o fúlvicos resultaba en la formación de trihalometanos (94), sustancias químicas que actúan directamente (95, 96).

12.2.2 Análisis de los concentrados de agua de bebida

Los trabajos recientes de Holmbom y colaboradores (97, 98, 99) y Meier y colaboradores (100, 101) han resultado en la identificación de una furanona ácida clorada, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, llamada MX, la cual aparece como el mayor contribuyente a la mutagenicidad tanto en aguas de bebida cloradas como de soluciones húmicas ácidas cloradas (97, 100), y que se genera a partir de la cloración de materiales húmicos.

La concentración de MX en aguas de bebida examinadas hasta el momento ha sido determinada en un rango de 2-67ng/L.

La contribución estimada del MX a la mutagenicidad de dos aguas de bebida en Finlandia resultó ser de un 5% y un 20% respectivamente (97).

En análisis más recientes, se examinaron 9 tipos de aguas de bebida, estimándose que el parámetro de mutagenicidad osciló entre un 20% y un 50% (98, 99).

Un isómero geométrico del MX, el ácido (E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenóico (E-MX), también ha sido identificado en varias muestras de aguas, pero parece ser un mutágeno de actividad más débil que el MX y supone una contribución insignificante a la mutagenicidad del agua (99). Sin embargo, su importancia radica en la capacidad de isomerizarse a MX.

En estudios llevados a cabo en tres aguas diferentes en USA, las contribuciones estimadas de mutagenicidad del MX fueron 15, 33 y 34% respectivamente (100).

Se ha demostrado que la estabilidad del MX depende tanto del pH como de la temperatura (99, 100).

13. EVIDENCIA DEL RIESGO

La actividad genotóxica ha sido observada usando sistemas de test *in vitro*, incluyendo células microbianas, cultivo de células de mamíferos y eucarióticas; en cambio, la existencia de genotoxicidad en estudios *in vivo* en animales completos ha sido muy pequeña o indetectable (100, 102).

El efecto observado con mayor frecuencia derivado de la exposición a los THMs, y en particular del cloroformo, es la carcinogenicidad (74).

Los THMs parecen poseer actividad como promotores tumorales como así lo indica la inducción de la regeneración de la hiperplasia y la inducción de marcadores moleculares como la ornitina decarboxilasa (103).

El Instituto Nacional del Cáncer (73) y otros autores (104, 105), han informado acerca de un incremento en la incidencia de tumores epiteliales de riñón en ratas machos y de hígado en ratones machos y hembras cuando se administró cloroformo vía oral mezclado con la alimentación (74), a dosis de 60mg/kg/día ó mayores.

También se ha informado acerca de una disminución en la inmunidad en ratones expuestos a dosis de 125mg/Kg/día de bromodiclorometano ó dibromoclorometano durante 14 días (106).

14. ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS

Al menos 20 estudios completos han examinado la relación entre productos orgánicos en agua de bebida y cáncer.

Los primeros estudios sobre genotoxinas en agua de bebida han sido discutidos en detalle por Loper (45). En la actualidad siguen apareciendo otras revisiones efectuadas por diversos autores (107, 108, 109).

14.1 Estudios Ecológicos

Se han llevado a cabo muchos estudios ecológicos relacionando la calidad del agua de bebida y el cáncer; las técnicas multivariantes empleadas en muchos de ellos permiten ajustar potenciales factores de confusión como pueden ser la medida del nivel socioeconómico, factores demográficos y la actividad industrial del municipio.

Uno de los primeros estudios ecológicos estudiaba la asociación existente entre las tasas de cáncer en el Estado de Louisiana y el uso del río Mississippi como fuente de agua de bebida, investigando la proporción de población expuesta al consumo de este agua de bebida. Se encontraron elevadas tasas de mortalidad por cáncer (el coeficiente de regresión fue significativo para la variable agua en caso del sistema renal, vejiga y riñón, y para los órganos gastrointestinales combinando estómago, intestino delgado y recto) en el territorio estudiado (110).

Burke et al. (111) examinaron la correlación entre las tasas de mortalidad por cáncer con los niveles de THMs medidos en muestras de agua. En este caso, no se encontró asociación, posiblemente porque los niveles de THMs fueran tan bajos que la exposición a ellos fuera insuficiente como para detectar el exceso de riesgo a través de técnicas epidemiológicas.

14.2 Estudios caso-control

Los primeros estudios de este tipo que se llevaron a cabo, utilizaron la información procedente de los certificados de defunción.

Young et al. (112), estudiaron la relación existente entre el cáncer de colon y agua de bebida entre mujeres blancas en el Estado de Wisconsin.

La influencia de la migración fue limitada por la ejecución del estudio en municipios de la zona con tasas de inmigración inferiores a 20 años. Se observó una relación estadísticamente significativa entre la mortalidad por cáncer de colon en mujeres blancas y la exposición a THMs en agua de bebida, estimada por el promedio de dosis de cloro diario en agua durante un período superior a 20 años.

En un estudio llevado a cabo en Carolina del Norte para investigar la posible relación entre la ingesta de agua clorada y el cáncer de colon, se llegó a la conclusión de que existe una relación muy fuerte en éste sentido; además la relación es altamente dependiente de la edad, no encontrándose asociación entre la cloración y el cáncer de colon por debajo de los 60 años; por encima de dicha edad, la relación era estadísticamente significativa, habiéndose controlado los posibles factores de confusión (113, 114).

Otra reciente información procede de un estudio caso-control donde se demuestra una evidencia adicional entre el agua clorada y el cáncer de recto y vejiga (43) en la población humana estudiada (115).

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que es de extrema importancia que los materiales mutagénicos procedentes del agua de bebida sean identificados o al menos caracterizados, ya que por un lado existe una correlación positiva entre mutagenicidad y carcinogenicidad en humanos (116), y por otra por el posible riesgo que supone sobre la salud comunitaria la exposición crónica a éste tipo de sustancias (100).

De ahí que uno de los objetivos más importantes de la U. S. Environmental Protection Agency (EPA) se refiera a los esfuerzos en cuanto a la investigación de efectos adversos resultantes de la presencia de productos de la desinfección en agua de bebida.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El propósito de esta Tesis es:

1. Comprobar si existe actividad mutagénica relacionada con muestras de aguas de consumo público de una comunidad mayor de 100.000 habitantes, a través del test de *Escherichia coli*.
2. En el caso de que se determine actividad mutagénica, valorar si dicha mutagenicidad puede atribuirse a los concentrados orgánicos que se generan por la desinfección del agua de consumo con cloro.
3. Evaluar si dicha mutagenicidad depende en parte de la presencia o ausencia de la fracción S9 de activación microsomal.
4. Determinar los índices de mutagenicidad correspondientes a cada una de las cepas para cada una de las muestras de estudio, tanto en presencia como en ausencia de S9.

1. FUNDAMENTO DEL METODO

El fundamento teórico del test se basa en la capacidad de ciertas cepas bacterianas para poner de manifiesto las alteraciones producidas en su material genético como consecuencia de la exposición a un compuesto mutagénico.

Las bacterias utilizadas son cepas de *Escherichia coli* portadoras de una mutación triptófano-dependiente (trp^-), que le impide fabricar uno de los enzimas requeridos para la síntesis del aminoácido triptófano (componente esencial de las proteínas). A consecuencia de ésta mutación, la bacteria no puede crecer en un medio nutritivo mineral a menos que el medio sea complementado con una fuente externa de triptófano.

En algunas ocasiones, la mutación trp^- sufre una reversión, una mutación reversa que restaura la secuencia normal en el código del ADN para el enzima requerido, y con ello devuelve el suministro interno de triptófano.

La reversión se descubre ya que sólo aquéllas bacterias que la sufren, pueden formar colonias en un medio sin triptófano. De ésta manera, la tasa de mutación reversa, que normalmente es muy baja, se incrementa considerablemente si la bacteria trp^- está expuesta a un producto que provoque dicha mutación.

Es pues un ensayo microbiano que permite medir la reversión $trp^- \rightarrow trp^+$, inducida por los productos químicos que provocan sustitución de base en el genoma del organismo o, como se define en las directrices de la OECD para los ensayos de productos químicos: "un ensayo de mutación reversa sobre *Escherichia coli*, detecta las mutaciones que tienen lugar en un gen de una cepa bacteriana trp^- dependiente para producir una cepa trp^- independiente".

Las cepas y los derivados utilizados, llevan el mismo defecto genético, pero las mutantes pueden crecer, sea por cambio de base en el lugar del defecto original, o por un cambio en cualquier otro lugar del cromosoma que suprima la alteración original.

Escherichia coli Cepa WP₂

Es la cepa original (tipo salvaje) eficiente en reparación.

Sus características principales son:

- uvr⁺ (sensible a radiaciones ultravioleta)
- trp E₆₅ (triptófano dependiente)
- mal B⁻ (no puede utilizar la maltosa como único azúcar, es preciso administrarla otra fuente de carbono)

Escherichia coli Cepa WP₂ uvrA⁻

Sus características son:

- uvr⁺ (sensible a radiaciones UV)
- uvrA⁻ 155 es deficiente en la reparación de la escisión del ADN y muestra un aumento en la mutabilidad debido a que el sistema de reparación perdido podía reparar de manera eficaz y completa la parte dañada de la molécula del ADN, esto permite usar una dosis más baja de la muestra a analizar para obtener el mismo efecto mutagénico.
- trp E₆₅ (triptófano dependiente)
- mal B⁻ (necesita una fuente de carbono distinta a la maltosa)

Escherichia coli Cepa WP₂ uvrA⁻ pKM 101

Posee las mismas características que las cepas anteriores además de las siguientes:

- factor R (plásmido pK 101), que le hace sensible a los mutágenos debido a una posterior reducción de su sensibilidad para reparar el daño del ADN a través de un mecanismo de escisión-replicación
- es resistente a la ampicilina

2.2 FRACCION MICROSOMAL DE HIGADO DE RATA

2.2.1 Fracción S9

Es una fracción rica en enzimas, cuyo objeto es metabolizar diferentes sustratos para evaluar su potencial genotóxico en test de mutagénesis bacterianos, de manera que en ensayo simula los procesos metabólicos que tienen lugar en los mamíferos.

La especie animal de la que se obtiene la fracción S9 es "inducida" mediante una droga metabolizante para aumentar el contenido total de enzimas por mg de tejido hepático.

Lo fundamental en su extracción y conservación, es preservar sus actividades enzimáticas.

Esto se consigue con un adecuado medio de aislamiento hepático y una temperatura baja durante su manipulación, llevándose a una temperatura mucho más baja (-30°C a -170°C) para su almacenamiento.

Esta preparación se obtuvo de IFFA CREDO, que la comercializa como "S9 Fraction".

Para su obtención se utilizan ratas macho tipo "SD-OFA" con un peso medio de 200 g. teniendo pienso y agua "ad libitum". Como inductor enzimático se ha empleado fenobarbital sódico administrado en el agua de bebida al 0,1%.

Los animales son sometidos a la exposición del inductor enzimático durante la semana anterior al sacrificio. Se retira el pienso y el agua 12 horas antes del sacrificio pasadas las cuales, se sacrifican los animales y se extraen los hígados.

Estos se colocan en recipientes de cristal que contengan ClK (0,15M) en una cantidad de 1 ml/gr. de hígado, posteriormente se transfieren los hígados a un recipiente que contiene ClK (0,15M) en una proporción de 3 ml/gr. de hígado y a continuación se homogeneiza con un homogeneizador de cristal y el resultante se centrifuga durante diez

minutos a 9000 revoluciones.

Se decanta el sobrenadante, que es lo que se denomina fracción S9. Las fracciones de S9 frescas se distribuyen en viales de plástico de 2 ml y se congelan rápidamente en nitrógeno líquido a - 80°.

Todas las operaciones antes citadas se realizan en cabinas de flujo laminar y a una temperatura entre 0°-4°C. Asimismo, tanto las soluciones como el material que se utiliza, han sido previamente esterilizados.

2.2.2 S9- mix (S9+)

La solución se prepara inmediatamente antes de su uso, añadiéndose por orden las siguientes preparaciones:

* Fracción microsomal S9	3,0 ml
* NADP (0,1M)	0,4 ml
* G-6-P (0,1M)	0,5 ml
* Cl ₂ Mg (0,1M)	0,5 ml
* ClK (0,33M)	1,0 ml
* Cl ₂ Mg (0,1M)	0,5 ml
* Buffer Fosfato (0,2M)	4.6 ml

En el S9 mix hay dos aspectos fundamentales:

- a) Es necesario emplear cofactores ricos en energía o con alto poder reductor para conseguir mayor rendimiento de las procesos enzimáticas.
- b) La concentración de cada uno de los cofactores ha de ser la adecuada para que se asegure la acción de cada uno de ellos.

3. METODOS

3.1 OBTENCION Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Las cepas fueron cedidas por el Dr. Mhl Green, Universidad de Brighton (Reino Unido), y por la Dra. Evelyn M. Witkin, Woskman Institute of Microbiology. Rutgers State, University of New York.

Tras la recepción de las cepas se procede a efectuar un subcultivo para su almacenaje y posterior aplicación en el método operatorio rutinario.

Para la obtención de los "stocks" bacterianos, se rayan placas de agar nutritivo a partir de un cultivo en fase estacionaria; cada cultivo se obtiene sembrando las cepas en frascos que contienen 10 ml de caldo nutritivo enriquecido con 10 μ g/ml de triptófano e incubado a 37°C durante 10-12 horas en un baño con agitación y en oscuridad.

Las placas rayadas se incuban a 37°C en estufa durante 24 horas; éstas placas se pueden conservar un mes a 4°C.

Para su almacenamiento a largo plazo se toma una sola colonia de las placas rayadas y se inocula por picadura en un tubo de cristal con tapón de corcho que contenga 2 ml de agar.

Los tubos se cierran herméticamente con parafina y se conservan a temperatura ambiente, pudiendo así sobrevivir varios años. Después de algunos días se ve si hay crecimiento en los tubos, y si es así, se procede a la verificación de las características genotípicas de las cepas.

3.2 VERIFICACION DE LAS CARACTERISTICAS GENOTIPICAS

Es esencial verificar (inmediatamente después de recibir las cepas, cuando aumenta el número de revertantes espontáneas, cuando hay pérdida de sensibilidad a mutágenos estándar) que las características de las cepas no hayan sufrido modificaciones, es decir, realizar un control de calidad de las mismas, para lo cual se efectúan los siguientes controles:

3.2.1 CONCENTRACION CELULAR

Se diluye el cultivo en fase estacionaria de cada cepa (obtenido por incubación en caldo nutritivo durante 10-12 horas en oscuridad) por un factor de dilución de 10^{-6} , usando pasos de dilución de 1 en 10 en tampón salino o en caldo nutritivo; se agitan los tubos diluidos en todos los pasos para evitar el agrupamiento de células.

Se vierten 0,1 ml de la dilución 10^{-6} en placas de agar nutritivo vehiculados en 2 ml de agar blando de superficie. Las placas se incuban durante 24 horas en estufa a 37°C.

Dado que se considera que un cultivo de noche tiene aproximadamente $1-2 \times 10^9$ cel/ml, transcurrido el período de incubación habrá aproximadamente 100-200 colonias/placa y no deberá haber contaminación alguna.

3.2.2 FRECUENCIA DE REVERSION ESPONTANEA DE LAS CEPAS

Se controla que la frecuencia de reversión espontánea de las cepas sea la adecuada, es decir:

- Cepa WP2: no superior a 25 mutantes espontáneas por placa
- Cepa WP2 $uvrA^-$: no excederá de 60 mutantes espontáneos por placa
- Cepa WP2 $uvrA^-$ pKM 101: entre 150-200 mutantes espontáneos por placa.

Procedimiento

Se añade 0,1 ml de cultivo bacteriano en fase estacionaria a 2 ml de agar blando, enriquecido con trazas de triptófano; el contenido de cada tubo se mezcla y se vierte en una placa de agar glucosado.

Si el ensayo se realiza con activación metabólica, se añaden además al tubo de agar blando 0,5 ml de mezcla S9; se deja solidificar y se incuban en estufa a 37°C durante 48 horas.

La tasa de reversión espontánea puede verse afectada por la presencia de mutágenos en el ambiente o por la concentración de triptófano en el top agar.

Finalizado el período de incubación, se cuentan las colonias revertidas en cada placa y si no se encuentran dentro del intervalo hay que desechar los "stocks" bacterianos.

3.2.3 RESPUESTA ANTE TESTIGOS POSITIVOS

Se realiza para confirmar la sensibilidad de las cepas bacterianas ante mutágenos. En nuestro ensayo los controles positivos se han realizado con las siguientes sustancias:

- Ensayo sin **activación metabólica**, se han empleado para todas las cepas los siguientes controles:

Metil-meta-sulfonato ($1 \cdot 10^{-2}$ mg/placa)

N-metil-N-nitrosoguanidina ($1 \cdot 10^{-2}$ mg/placa)
- Ensayo con **activación metabólica**, se empleó como testigo positivo para todas las cepas el 2-aminoantraceno a una concentración de $1 \cdot 10^{-4}$ mg/placa.

Procedimiento

Se procede como en el caso anterior, pero añadiendo además 0,1 ml del control positivo en el tubo de agar blando.

3.2.4 SENSIBILIDAD A LA LUZ ULTRAVIOLETA

Las cepas que llevan la mutación *uvr* son sensibles a la luz ultravioleta, pudiéndose demostrar ésta característica mediante dos sistemas:

Procedimiento

- Irradiando placas sembradas previamente con una lámpara ultravioleta de 15 W, en diferentes dosis y comprobando la sensibilidad relativa de cada cepa al no haber crecimiento bacteriano tras una incubación adecuada.
- En vez de usar la radiación ultravioleta como fuente de referencia que lesiona el ADN, se puede emplear como método alternativo a la Mitomicina C utilizando placas de agar nutritivo para la siembra.

3.2.5 RESISTENCIA A LA AMPICILINA DE LA CEPA WP2 *uvrA* pKM 101

Se realiza para la confirmación del plásmido pKM 101, ya que éste le confiere la propiedad de hacer resistentes las bacterias a la ampicilina.

Procedimiento

Se añade 0,1 ml de cultivo en fase estacionaria a un tubo con 2 ml de agar blando y se vierte sobre placas de agar nutritivo, se deja secar y se deposita en la placa un disco que contiene 10 mcg de ampicilina; se incuba 24 horas en estufa a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, las cepas sensibles a la ampicilina (carecen del factor R) presentarán un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco y la cepa WP2 *uvrA* pKM 101 que es resistente a la misma, tendrá un crecimiento normal con ausencia del halo de inhibición (confirmación de la existencia del factor R).

También puede comprobarse esta característica sembrando cada cepa a analizar en 10 ml de caldo nutritivo al que se le ha añadido ampicilina a una concentración de 0,29µg/ml durante 16 horas en baño a 37°C, con agitación y en oscuridad.

Transcurrido el tiempo de incubación, si la cepa no tiene plásmido, no crecerá.

3.3 OBTENCION DEL CULTIVO EN FASE ESTACIONARIA

Es lo que se conoce con el nombre de cultivo de noche.

Se realiza en campana de flujo laminar bajo condiciones de total esterilidad.

Procedimiento

A un matraz que contiene 100 ml de caldo nutritivo se le añaden 10 μ l de solución de triptófano, se agita y se reparte en frascos estériles con tapón de rosca a razón de 10ml por frasco.

Se utilizan dos frascos por cepa y otros dos se dejan como testigos.

A continuación, de los viales de conservación de las cepas correspondientes y por picadura, se siembran en el caldo nutritivo enriquecido con el triptófano.

Los frascos se preservan de la luz envolviéndolos en papel de aluminio y se sumergen en un baño maría con agitación a 37°C durante 12 horas; transcurrido éste tiempo se sacan del baño y se guardan en frigorífico hasta el momento de la siembra.

3.4 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD

El ensayo de mutación reversible en *Escherichia coli* puede realizarse mediante dos métodos:

- a) Método de preincubación
- b) Método de incorporación directa en placa

Se ha elegido el segundo de los métodos que en síntesis consiste en que las bacterias y la sustancia problema se mezclan con agar blando o de superficie y se vierten en la superficie de una placa de agar glucosado.

Este método se ha realizado con dos variantes:

1. Con incorporación de activación enzimática S9-mix (S9+):

Para una mayor sensibilidad en la detección de mutágenos se efectúa el ensayo con activación metabólica.

Para ello, utilizamos la fracción S9 y así sometemos a la sustancia problema a los procesos metabólicos de los mamíferos, puesto que normalmente no es la forma original de una sustancia mutagénica la que es activa, sino sus metabolitos.

2. Sin incorporación de activación enzimática (S9-):

Las cepas bacterianas utilizadas son WP2, WP2 *uvrA*⁻ y WP2 *uvrA*⁻ pKM 101; se han cultivado a 37°C hasta el final de la fase estacionaria de crecimiento.

La densidad celular oscila entre $1-2 \times 10^9$ células por mililitro.

Después de realizar los controles de calidad de medios y soluciones, y de haber verificado el buen estado de las cepas, como se ha indicado anteriormente, se procede a la preparación de las muestras problema.

Seguidamente se pasa a la realización del ensayo.

Procedimiento

A 100 ml de agar blando licuado a una temperatura de 45°C, se incorporan 10 ml de la solución estéril de L-triptófano, se agita y se distribuyen en tubos estériles a razón de 2 ml por tubo, manteniéndose en un baño con agua a 45°C.

En el ensayo sin incorporación de activación enzimática, a los tubos de 2 ml de agar blando se añade 0,1 ml de la sustancia problema y 0,1 ml del cultivo bacteriano fresco (en fase estacionaria).

Para los ensayos con activación enzimática se añade al agar blando 0,5 ml de la mezcla de activación enzimática (S9).

El contenido de cada tubo se mezcla y se vierte en la superficie de una placa de agar glucosado. El agar se deja solidificar y las placas se incuban a 37°C durante 48-72 horas.

Finalizado el período de incubación, se cuentan las colonias revertidas de cada placa.

Cada placa utilizada en el ensayo ha sido realizada por triplicado. El ensayo se repite de nuevo posteriormente y en las mismas condiciones.

El ensayo se ha realizado con los siguientes grupos de muestras con y sin activación metabólica:

3.4.1 ENSAYO CON FRACCION MICROSOMAL (S9+)

En cada ensayo se realizan los siguientes grupos de controles:

a) Control negativo

0,1 ml de cepa
0,5 ml de S9+

b) Control con disolvente

0,1 ml de cepa
0,5 ml de S9+
0,1 ml de DMSO al 20%

c) Control positivo

0,1 ml de cepa
0,5 ml de S9
0,1 ml de mutágeno estándar

d) Test

0,1 ml de cepa
0,5 ml de S9
0,1 ml de muestra problema

3.4.2 ENSAYO SIN FRACCION MICROSOMAL

a) Control negativo

0,1 ml de cepa

b) Control con disolvente

0,1 ml de cepa

0,1 ml de DMSO al 20%

c) Control positivo

0,1 ml de cepa

0,1 ml de mutágeno estándar

d) Test

0,1 ml de cepa

0,1 ml de muestra problema

3.5 CONTROLES DE ESTERILIDAD DE LOS ENSAYOS CON *E. coli*

Se han realizado los siguientes controles dirigidos a garantizar y comprobar la esterilidad de los medios utilizados:

1. Dos tubos de agar blando con 0,5 ml de fracción microsomal se decantan en sendas placas de agar glucosado y se incuban en estufa durante 48-72 horas a 37°C.
2. Dos tubos de agar blando se mezclan con 0,1 ml de agua destilada estéril que se ha utilizado para hacer las diluciones de las muestras, y se decantan en sendas placas de agar glucosado. Se incuban en estufa a 37°C durante 48-72 horas.
3. Dos tubos que contienen agar blando y que provienen del mismo matraz que los empleados en la siembra, se introducen en el mismo baño a 45°C y son extendidos al final de la siembra en placas de agar glucosado, se incuban en estufa a 37°C durante 48-72 horas junto con las placas inoculadas, hasta el momento de la lectura.
4. Dos placas de agar glucosado, de la misma fecha de realización de las empleadas para la siembra, son incubadas en estufa a 37°C durante 48-72 horas.

4. MATERIAL DE LABORATORIO

4.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES

4.1.1 REACTIVOS

Los reactivos utilizados han sido:

- Mutágenos standard
 - 2-Aminoantraceno $C_{14}H_{11}N$ (Aldrich)
 - N-metil-N-nitrosoguanidina $C_2H_5O_3N_5$ (Aldrich)
 - Metil-metano-sulfonato $C_2H_6O_3S$ (Merck)
- Acetonitrilo CH_3CN (Panreac)
- Metanol CH_3OH (Merck)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) $(CH_3)_2SO$ (Panreac)
- L-Triptófano $C_{11}H_{12}N_2O_2$ 0.5mM (Merck)
- Solución de Cristal Violeta (Panreac)
- Discos de Ampicilina (Oxoid)
- Hipoclorito Sódico
- Permanganato potásico $KMnO_4$ (Panreac)
- Acido Oxálico 2-hidrato $(COOH)_2 \cdot 2H_2O$ (Panreac)
- Acido sulfúrico 96%, SO_4H_2 (Panreac)
- Discos estériles de papel de filtro (Difco)
- Filtros de membrana 0.2 mm (Millipore)
- O-Tolidina solución 0,1% (Panreac)

- Agua bidestilada Bio-Sell s.a.l.

4.1.2 SOLUCIONES

1. *Solución de Buffer-Fosfato (pH = 7.4)*

- Fosfato monosódico NaH_2PO_4 (0.2M) (Merck) 60 ml
- Fosfato disódico Na_2HPO_4 (0.2M) (Merck) 440 ml

Se autoclava 20 minutos a 121° C y se conserva a 4° C hasta su uso.

2. *Solución de L-Triptófano 0,05M*

- L-Triptófano 25,00 mg
- Agua bidestilada 250 ml

La solución se esteriliza filtrandola a través de una membrana de Millipore y bajo campana de flujo laminar, se guarda en frasco con tapón de rosca protegida de la luz, a 4°C hasta su utilización.

3. *Solución de Vogel-Bonner*

- Agua bidestilada templada (45°C) 670 ml
- Sulfato magnésico $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 gr
- Acido cítrico monohidratado 100 gr
- Fosfato potásico dibásico (anhídrido) 500 gr
- Sodio amonio fosfato $\text{NaH}_2\text{N}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 175 gr

Añadir las sales en el orden indicado, permitiendo a cada sal disolverse antes de añadir la siguiente. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Se guarda a 4°C protegida de la luz hasta su uso.

4. *Solución de Glucosa al 40%*

- Glucosa anhidra $C_6H_{12}O_6$ (Merck) 40 gr
- Agua bidestilada 100 ml

Se autoclava la solución durante 20 minutos a 121°C y se conserva a 4°C.

4.2 MEDIOS

1. Medio Agar

- Agar 15 gr
- Agua bidestilada 930 ml

Una vez mezclado, se lleva a ebullición por llevar agar. Se autoclava 20 minutos a 121°C y se guarda a 4°C hasta su uso.

2. Agar blando (Top Agar)

- Agar 6 gr
- Cloruro sódico 5 gr
- Agua bidestilada 1000 ml

Se procede igual que en el caso anterior.

3. Agar Nutritivo

- Nutrient Broth nº2 25 gr
- Agar 15 gr
- Agua bidestilada 1000 ml

Se prepara en un matraz y se hierve (por llevar agar). Se autoclava durante 20 minutos a 121°C. Se plaquea directamente sin añadir ninguna otra solución (Placas de agar nutritivo).

4. Medio Agar Glucosado

- Medio agar 465 ml
- Solución Vogel-Bonner 10 ml
- Solución Glucosa al 40% 25 ml

El agar se licúa mediante calor y a continuación se añaden con pipeta y en cabina de flujo laminar los demás componentes. Se agita bien y después se deja reposar durante 4 ó 5 minutos con el fin de que desaparezcan las burbujas y se plaquea a continuación (Placas de agar glucosado).

5. Caldo Nutritivo para cultivo de noche

- Nutrient Broth nº 2 25 gr
- Agua bidestilada 1000 ml

Se disuelve (no es necesario hervir), y se reparte en frascos de 25 ml de capacidad, a razón de 9 ml de caldo cada uno. Se autoclava durante 20 minutos a 121°C y se guarda en nevera durante tres meses a 4°C. En el ensayo con *Escherichia coli* se suplementa con 1 ml de solución de L-Triptófano.

4.3 MATERIAL E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- Cabina de flujo laminar (Telstar)
- Autoclave
- Estufa de cultivo
- Arcón Congelador Revco (Giralt)
- Baño Selecta con agitación y temperatura regulable (Unitronic)
- Placa magnética caliente agitadora
- Agitador de tubos

- Microscopio
- Balanza de precisión
- Contador de placas
- Rota-vapor
- Bomba peristáltica de velocidad fija (Waters)
- Micropipeta Digital
- Material no reutilizable:
 - Placas Petri estériles de 100 mm de diámetro
 - Criotubos Nunc (1.8 ml)
 - Jeringas estériles de un sólo uso
 - Tubos estériles de 16 por 100 mm
- Material reutilizable:
 - Pipetas de vidrio
 - Puntas de micropipeta
 - Tubos de vidrio
 - Frascos con tapón de rosca
 - Matraces

5. MUESTRAS DE AGUA

Para valorar la posible mutagenicidad derivada de la presencia de compuestos clorados en el agua de la red de la ciudad de Madrid, se siguieron los siguientes pasos:

5.1 PREENSAYO

El ámbito geográfico del estudio, en principio quedó delimitado por el área municipal de Madrid.

Bajo el reinado de Isabel II, se terminó en 1852 el Canal de Castilla, del que se creó el Canal de Isabel II que desde 1857 abastece a Madrid.

En la actualidad, el Canal de Isabel II abastece a Madrid capital y a la mayoría de los municipios y núcleos urbanos de la Comunidad Autónoma de Madrid (el 95% de la población).

5.1.1 RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

El preensayo abarcó un muestreo de seis depósitos reguladores de agua del área de estudio. Estos puntos de recogida fueron:

- a) Santa Engracia
- b) Islas Filipinas
- c) Plaza de Castilla
- d) Hortaleza
- e) Vallecas
- f) San Blas

Se recogieron un total de 30 muestras de agua de los 6 puntos de muestreo, durante los meses de Septiembre a Noviembre de 1991.

5.1.2 ANALISIS DE LAS MUESTRAS

Los análisis que fueron efectuados a las muestras de agua recogidas fueron:

5.1.2.1 Determinación del cloro libre residual

De acuerdo con el Artículo 20 de la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de las aguas potables de consumo público recogido en el Real Decreto 1138/1990, de 14 de Septiembre de 1990 (80), las aguas potables deben contener a lo largo de toda la red de distribución del sistema de abastecimiento y en todo momento, cloro residual libre o combinado (u otro agente desinfectante en su caso), en las concentraciones que determine la Administración Sanitaria competente.

En Madrid, como en el resto del territorio nacional, la concentración exigida de desinfectante es de 0.2-0.4 ppm de CLR (cloro libre residual).

Para determinar la dosis de cloro del agua problema, se eligió el método de la ortotolidina (118).

La ortotolidina reacciona con el cloro residual, dando una coloración amarillenta proporcional a la cantidad de cloro del agua.

La reacción consta de dos fases:

- a. Reacción con el cloro libre residual
- b. Reacción con el cloro libre combinado

De las dos fases, sólo fue de nuestro interés la primera o reacción con el cloro libre residual, que es prácticamente instantánea con la aparición de la coloración en menos de 15 segundos.

Después, el vial con el agua problema es enfrentado a la escala colorimétrica que contiene el clorómetro, la cual nos da, de una forma aproximada, la dosis de CLR en ppm que tiene ese agua.

5.1.2.2 Valoración de la cantidad de materia orgánica total

Como medida indirecta de la cantidad de materia orgánica total, se usó el método de la oxidabilidad al permanganato o demanda química de oxígeno, más conocido como DQO (118, 119).

Según la Reglamentación Técnico-Sanitaria anteriormente citada, el nivel guía para el agua potable en nuestro país, es de 2mg/l de O_2 , y la concentración máxima admisible es de 5mg/l de O_2 .

Procedimiento

Se distinguen dos fases:

1. Cálculo del factor del permanganato potásico: a un matraz de 500 ml se le añaden 100 ml de agua destilada, 15 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de permanganato N/100. Se pone al fuego y cuando hierva se añade al líquido anterior, que es rosado, ácido oxálico hasta que la solución se vuelva incolora. Posteriormente se añaden 10 ml de ácido oxálico N/100 y se valora el factor añadiendo permanganato gota a gota hasta obtener un color levemente rosado (en función de los ml de permanganato empleados).
2. Cálculo de la D.Q.O.: se tira el líquido anterior y en el mismo matraz sin lavarlo, se añaden 100 ml del agua problema, 10 ml de ácido sulfúrico al tercio, y se lleva a ebullición. Se añaden 10 ml de permanganato, y de nuevo se lleva a ebullición 10 minutos exactos. Entonces se añaden 10 ml de ácido oxálico (líquido incoloro) y se valora añadiendo permanganato gota a gota hasta que aparece el color rosado mantenido. En función del permanganato gastado y del factor antes calculado, se obtiene los mg/l de O_2 , que contiene el agua problema y que corresponde a la Demanda Química de Oxígeno de ese agua.

5.1.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos en el preensayo, tanto en lo que respecta a la determinación del cloro libre residual como de materia orgánica total, fueron analizados por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) (120), para comprobar si las diferencias aparecidas en los resultados de los seis puntos de muestreo eran significativas.

5.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras de estudio pueden clasificarse en tres grupos:

- Muestra 1: Concentrado de 5 litros de agua
- Muestra 2: Concentrado de 10 litros de agua
- Muestra 3: Concentrado de 15 litros de agua

5.2.1 TOMA DE MUESTRAS DE AGUA DE LA RED

Dado que tras analizar los resultados del preensayo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de los seis puntos de recogida, se decidió recoger las muestras de la red de distribución del distrito de Moncloa, Madrid, durante los meses de Octubre de 1991 a Junio de 1992.

Para efectuar las tomas, se siguió la metodología oficial para análisis de aguas, que viene recogida en la Orden Ministerial de 27 de Junio de 1983, publicada en el BOE de 13 de Agosto de 1983.

Para recoger el agua, se emplearon recipientes estériles y opacos para proteger las muestras de la luz. Antes de tomar la muestra, se flamea el extremo del grifo y se deja que el agua fluya abundantemente para que se renueve la contenida en la tubería de alimentación.

La toma siempre debe ser representativa de la calidad del agua que hay que analizar.

Una vez tomadas, las muestras se conservan en nevera a 4°C, hasta su procesamiento. Este debe ser inmediato a la recogida, ya que está demostrado que si no se hace así, los derivados clorados se pierden.

Las muestras de agua que van a ser ensayadas, deben ser previamente filtradas por membrana Millipore con poro de 0.2 mm, para garantizar su esterilidad.

5.2.2 ANALISIS DE LAS MUESTRAS

1. Determinación del cloro libre residual

Se utilizó el método de la ortotolidina, tal como se describe anteriormente en el ensayo.

2. Valoración de la cantidad de materia orgánica

Este análisis se efectuó por el método anteriormente descrito de la Oxidabilidad al Permanganato o Demanda Química de Oxígeno.

3. Determinación del pH

Según la reglamentación en vigor, el pH del agua de bebida (nivel guía), es de 6.5-8.8, es decir, neutro. El máximo admisible está fijado en 9.5.

El pH se midió por medio de un Indicador de pH en tiras reactivas (Merck); para obtener el valor del pH, se sumerge la varilla en el agua problema hasta el cambio de color de ésta (1-10 minutos) y se compara entonces con la escala colorimétrica.

5.2.3 CONCENTRACION DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras fueron procesadas con el fin de concentrar los solventes orgánicos que pudiesen contener, buscando con ello obtener los mejores resultados de los tests bacterianos.

El método elegido fue el sistema Sep-Pak de Waters (Millipore).

El Sep-Pak es un dispositivo fabricado por Waters Associates Inc, que podría definirse como una técnica perfeccionada de la cromatografía de columna. El cartucho de Sep-Pak, se acopla a una bomba de agua, o simplemente a una jeringa, pasando así la muestra o los eluyentes con cierta presión.

De entre los diferentes cartuchos Sep-Pak, se ha empleado el C₁₈ Cartridge, diseñado especialmente para muestras disueltas en agua, agua con tampones, agua-acetonitrilo, agua-metanol, es decir, agua con disolventes acuosos.

En cuanto a las características físico-químicas de estos cartuchos, hay que señalar que el cartucho C₁₈, contiene 360 mg de sorbente, constituido por partículas de entre 55-105 milimicras de tamaño y con poros de 125 Å.

Cada cartucho tiene una capacidad de retención que abarca desde 1-2 miligramos hasta 100 miligramos, dependiendo del tipo de compuesto. En ningún caso pasar más de 1000-1500 ml de agua a través de un sólo cartucho, para evitar la hidrólisis del sorbente.

Procedimiento

Antes de usar los cartuchos, deben ser preparados, haciendo pasar por cada uno de ellos, 5 ml de acetonitrilo (121). El agua es impulsada a través del cartucho por medio de una bomba peristáltica de velocidad fija.

5.2.4 EXTRACCION CON DISOLVENTES

Dado que las muestras de agua contienen compuestos orgánicos de distintas características físico-químicas (compuestos polares y no polares), para aumentar la eficacia del procedimiento de extracción se pasaron tres tipos de disolventes, en orden de polaridad, de más a menos polaridad:

* Agua destilada: 10 ml

* Metanol: 10 ml

* Acetonitrilo: 10 ml

Procedimiento

Los tres disolventes se recogieron por separado, y se procesaron por separado, en un Rota-Vapor, hasta obtener un residuo seco en forma de polvo. Posteriormente el residuo se redisolvió en 10 ml de DMSO al 20% (38) y se guardó en nevera a 4°C, protegido de la luz, hasta su utilización.

6. CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO

6.1 METODO BASADO EN EL CALCULO DEL INDICE DE MUTACION

Se denomina Indice de Mutagenicidad al cociente resultante de dividir los revertantes inducidos entre los revertantes espontáneos. El Indice de Mutagenicidad es un término equivalente al incremento relativo de revertantes (122).

El número de revertantes por placa corresponde en realidad, a la media del número de revertantes obtenido en las tres placas de cada nivel de dosis, pues como ya se ha dicho, todas las experiencias se realizan por triplicado.

En nuestro caso hemos utilizado, para evaluar el Indice de Mutagenicidad la llamada "regla de las dos veces" (123). Atendiendo al Indice de Mutagenicidad, los valores comprendidos entre 1.5 y 2 se consideran como "ligera mutagenicidad" y los valores superiores a 2, "mutagenicidad positiva".

La cualidad es una estimación del Indice de Mutagenicidad y así las distintas anotaciones correspondientes a la cualidad tienen el siguiente significado:

NM = No Mutagenicidad (Indice menor de 1.5)

LM = Ligera Mutagenicidad (Indice entre 1.5 y 2)

MP = Mutagenicidad positiva (Indice mayor de 2)

T = Efecto tóxico (Ausencia de césped bacteriano)

6.2 METODO ESTADISTICO BASADO EN EL ANALISIS DE LA VARIANZA

Debido a que hemos utilizado distintas dosis del producto a analizar sobre diferentes grupos de cepas y con el fin de evaluar si las diferencias obtenidas entre unos y otros grupos eran o no significativas, se ha empleado el método descrito por Moore y Felton (124) que consiste en un análisis de varianza modelo I (ANOVA I) de los datos, para comparar las diferencias entre grupos debidas a las distintas dosis del producto a analizar.

Como las condiciones de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos se cumplían en todos los casos, no fue necesaria la aplicación de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

IV. RESULTADOS

1. RESULTADOS DEL PREENSAYO

De acuerdo con lo especificado en el apartado de Materiales y Métodos, el primer paso de nuestro estudio fue realizar un preensayo que abarcó un muestreo de seis depósitos reguladores de agua del área de estudio, que en principio se extendía a toda el área municipal de Madrid.

En total se recogieron 30 muestras de agua de cada uno de los puntos mencionados.

En todos los casos se determinó el cloro libre residual y la materia orgánica total.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1.1. DETERMINACION DEL CLORO LIBRE RESIDUAL

Los resultados obtenidos para cada una de los seis puntos de muestreo están recogidos en la Tabla A.

La media total de cloro libre residual para las seis determinaciones fue de 0.1366 ppm, con una desviación estándar de 0.081.

El análisis estadístico mediante el ANOVA, no fue significativo ($p > 0.05$), por lo que podemos afirmar que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos puntos de muestreo, en cuanto a la cantidad de cloro libre residual que se detecta al final del sistema de distribución.

1.2. DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE MATERIA ORGANICA TOTAL

La determinación de la cantidad de materia orgánica para cada uno de los puntos mencionados se detallan en la Tabla B.

La media de las seis determinaciones nos dio una cifra de materia orgánica total de 1.6566 mg/l (des. st. = 0.05).

El análisis de la varianza no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los seis puntos de muestreo realizados.

PTOS DE MUESTRA	Nº DET	X CONC CL	D. STANDARD
SANTA ENGRACIA	30	0.13	0.062
I. FILIPINAS	30	0.13	0.053
P. CASTILLA	30	0.13	0.047
HORTALEZA	30	0.14	0.050
VALLECAS	30	0.14	0.050
SAN BLAS	30	0.15	0.050

ANOVA F = 0.798
p = 0.5528

TABLA A. PRE-ENSAYO: DETERMINACION DE CLORO LIBRE RESIDUAL.

PTOS DE MUESTRA	Nº DET	X CONC MO	D. STANDARD
SANTA ENGRACIA	30	1.88	0.225
I. FILIPINAS	30	1.98	0.192
P. CASTILLA	30	2.01	0.187
HORTALEZA	30	1.98	0.192
VALLECAS	30	1.88	0.240
SAN BLAS	30	2.01	0.196

ANOVA F = 0.464
 p = 0.7620

TABLA B. PRE-ENSAYO: DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA.

2. RESULTADOS DEL ENSAYO

Con el fin de valorar la posible mutagenicidad derivada de la presencia de compuestos orgánicos clorados en un agua de consumo público, previamente desinfectada con cloro, procedimos a realizar cuatro ensayos de mutagenicidad por medio del test de *Escherichia coli*, durante el periodo de estudio.

Estos ensayos vienen recogidos en las tablas de resultados y se denominan ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3 y ensayo 4.

Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado (ensayos 1 y 2; ensayos 3 y 4), tal como exige el protocolo de estudio, y sembrando siempre tres placas por cada experiencia, lo que supone 12 datos para cada una de las tomas analizadas con cada una de las cepas, y otras doce al realizarse el experimento añadiendo la fracción microsomal (S9+).

Previamente a la realización de los mismos, se procedió a analizar las muestras de agua tomadas de la red, siguiendo la pauta descrita en el Preensayo y determinando además el pH del agua.

En todos los casos, estos tres parámetros estuvieron dentro de los límites de la normalidad, tal y como se comprobó con las determinaciones que se hicieron durante el preensayo:

- Cloro libre residual: 0.2 a 0.4 ppm
- Materia orgánica total inferior a 3 mg/L
- pH neutro

Las muestras de estudio se clasificaron en tres grupos:

- * Muestra 1: Correspondiente al residuo orgánico extraído de 5 litros de agua problema.

- * Muestra 2: Correspondiente al residuo orgánico extraído tras la concentración de 10 litros de agua problema.
- * Muestra 3: Concentrado de 20 litros de agua problema

Todas las muestras se disolvieron en dimetilsulfóxido diluido al 20% antes de incorporarlas al ensayo.

En cada experiencia se ensayaron las tres cepas descritas en el apartado de Materiales y Métodos: WP2, WP2 uvrA, WP2 uvrA pKM 101.

Además en cada ensayo se incluyeron el control negativo, el control con disolvente y el control positivo.

Se realizaron también los correspondientes controles de supervivencia bacteriana y no se observó en ningún caso ni halo de inhibición bacteriana, ni ausencia de césped lo que indicó que no existió toxicidad con ninguna de las muestras ensayadas.

Los resultados individuales de cada ensayo vienen descritos en las tablas de resultados y en ellas se especifican los siguientes parámetros:

- Muestras: 1, 2, 3, DMSO (control con DMSO) y M.E. (mutación espontánea)
- RV/P: Revertantes por placa
- M.R.: Media de revertantes
- I.M.: Índice de mutagenicidad
- C : Cualidad

La cualidad refleja el valor del Índice de mutagenicidad. Cuando dicho índice alcanza valores comprendidos entre 1.5 y 2 se considera "ligera mutagenicidad" (L.M.); si el índice es superior a 2 corresponde a "mutagenicidad positiva" (M.P.) y todo valor inferior a 1.5 equivale a "no mutagenicidad" (N.M.).

En cuanto al análisis estadístico, se detallan en cada una de las tablas el Análisis de la Varianza (ANOVA) para los experimentos con y sin S9.

2.1 CEPA WP2

2.1.1 ENSAYO 1

Los resultados que se obtuvieron de la realización de este ensayo vienen reflejados en la Tabla I.

Con respecto al ensayo con fracción microsomal se aprecia un mayor número de revertantes inducidos que en el ensayo sin fracción S9+, pero por contra los índices de mutagenicidad fueron inferiores, siendo todos no mutagénicos (valores de 0.82, 1.01 y 1.31 para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente).

La disminución de la actividad mutagénica en el ensayo con fracción S9 queda reflejada además por el resultado del ANOVA, ya que este fue estadísticamente significativo, estableciéndose una relación directa entre el aumento en el número de revertantes inducidos con respecto al incremento de la concentración de las muestras analizadas.

En la Tabla II, se detallan los resultados de los controles positivos realizados con N-metil-N-nitroso-guanidina para la mutación sin S9+ y con 2-Aminoantraceno para el ensayo con S9+. La cepa respondió adecuadamente en los dos casos, obteniéndose un número de revertantes inducidos de al menos el doble de la media de mutación espontánea esperada.

El análisis de supervivencia también fue satisfactorio (Tabla III).

2.1.2 ENSAYO 2

En el ensayo 2 sin activación metabólica, tal como se describe en la Tabla IV, el mayor número de revertantes por placa se obtuvo con la muestra 2 (concentración intermedia). El mayor valor de índice de mutagenicidad se alcanzó en el caso de la

ENSAYO 1 CEPA WP2

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	35 40 43	39.3	1.03	N.M.	48 40 43	43.6	0.82	N.M.
2	52 45 44	47.0	1.23	N.M.	58 53 50	53.6	1.01	N.M.
3	63 58 56	59.0	1.55	L.M.	65 70 74	69.6	1.31	N.M.
DMSO	36 40 38	38.0		N.M.	52 48 59	53.0		N.M.
ME	22 .17 15	18.0			23 13 20	18.6		

ANOVA

F = 19.834 p = 0.0001

F = 13.580 p = 0.0005

TABLA I. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA WP2

TABLA II. ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO PARA LA CEPA WP2

MUTACION SIN S9

PATRON: N-metil-N'nitro-N-nitroso-guanidina ($1 \cdot 10^{-2}$ mg/placa)

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	INDICE DE MUTACION
I-II	430, 472, 465	455,67	22,50	21,36
III-IV	435, 486, 472	464,33	26,35	20,19

MUTACION CON S9

PATRON: 2-Amino antraceno ($1 \cdot 10^{-4}$ mg/placa)

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	INDICE DE MUTACION
I-II	400, 395, 462	419,00	37,32	17,96
III-IV	450, 400, 424	424,67	25,01	18,46

TABLA III. SUPERVIVENCIA DE LA CEPA WP2

ENSAYO I-II

DILUCION (bacterias/placa)	FRACCION S9 (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/ placa)	MEDIA
10^{-6}	-	-	117, 144, 108	123,00
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	-	120, 135, 112	122,33
10^{-6}	-	10^{-1}	143, 128, 122	131,00
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	136, 142, 119	132,33

ENSAYO III-IV

DILUCION (bacterias/placa)	FRACCION S9 (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/ placa)	MEDIA
10^{-6}	-	-	110, 105, 102	105,67
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	-	103, 104, 110	105,67
10^{-6}	-	10^{-1}	129, 140, 135	134,67
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	125, 110, 137	124,00

ENSAYO 2 CEPA WP2

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	40 36 42	39.3	0.91	N.M.	19 25 22	22.0	0.57	N.M.
2	71 70 66	69.0	1.60	L.M.	56 60 50	55.3	1.45	N.M.
3	62 69 64	65.0	1.51	L.M.	57 55 48	53.3	1.40	N.M.
DMSO	42 49 38	43.0		N.M.	33 42 39	38.0		N.M.
ME	23 18 20	20.3			17 13 22	17.3		

ANOVA F = 41.489 p = 0.0000 F = 30.763 p = 0.0000

TABLA IV. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA WP2

muestra 2, siendo de 1.60 lo que indica la calificación de "ligera mutagenicidad", para el caso de las muestras 1 y 3 los índices de mutagenicidad fueron de 0.91 y 1.51 respectivamente.

El análisis estadístico resultó ser significativo, por lo que se puede establecer una relación entre la variación en el número de revertantes y las distintas concentraciones estudiadas.

Al añadir al ensayo la fracción microsomal, disminuye la mutagenicidad en todas las muestras, tanto en lo referente a la media de revertantes inducidas como a los índices de mutagenicidad, los cuales resultaron ser todos no significativos.

El ANOVA del ensayo con incorporación de la fracción microsomal fue nuevamente significativo, pudiéndose establecer por tanto una relación directa entre el aumento del número de colonias y las diferentes concentraciones ensayadas.

Tanto los controles positivos (Tabla II), como el análisis de supervivencia (Tabla III) para la cepa en cuestión, se realizaron paralelamente al estudio y no apareció efecto indeseable alguno, ni signos de toxicidad.

2.1.3 ENSAYO 3

La descripción de los resultados de este ensayo viene reflejada en la Tabla V, donde se muestran los resultados obtenidos con cada una de las muestras problema así como con los controles negativos y con el disolvente.

En el ensayo sin S9+, obtenemos medias de revertantes por placa que van aumentando de forma progresiva según aumenta la concentración de las muestras. Los índices de mutagenicidad fueron "no mutagénicidad" para las muestras 1 y 2 (1.08 y 1.33 respectivamente), y para la muestra 3 se alcanzó el grado de "ligera mutagenicidad" (1.58). El ANOVA de este ensayo fue significativo.

ENSAYO 3 CEPA WP2

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	39 43 30	37.3	1.08	N.M.	30 38 42	36.6	0.80	N.M.
2	45 50 43	46.0	1.34	N.M.	48 45 45	46.0	1.01	N.M.
3	58 50 54	54.0	1.57	N.M.	65 60 52	59.0	1.29	N.M.
DMSO	30 34 39	34.3		N.M.	46 45 46	45.6		N.M.
ME	23 18 19	20.0			22 19 20	20.3		

ANOVA

F = 7.177 p = 0.0054

F = 12.525 p = 0.0007

TABLA V. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA WP2

En el caso del ensayo con incorporación de la fracción microsomal, la media de revertantes fue paralela a la media obtenida en el ensayo si S9+, sin embargo los índices de mutagenicidad fueron muy inferiores, resultando todos ellos no mutagénicos. Igualmente el análisis de la varianza fue significativo.

Los controles positivos se llevaron a cabo con los mutágenos estándar adecuados para la cepa, a los que ésta respondió adecuadamente (Tabla II).

La medida de la supervivencia bacteriana fue correcta tanto con como sin S9+ (Tabla III).

2.1.4 ENSAYO 4

Los resultados obtenidos de este ensayo vienen descritos en la Tabla VI.

En el ensayo con fracción microsomal se aprecia un incremento en la media de colonias inducidas, alcanzando el valor máximo para la muestra 3, máxima concentración. Los índices de mutagenicidad fueron de 1.27, 1.50 y 1.75, es decir, se alcanzó el calificativo de "ligera mutagenicidad" para las muestras 2 y 3, no así para la 1.

El análisis estadístico fue significativo, con lo que podemos establecer una relación directa entre el aumento del número de colonias y las diferentes concentraciones de las muestras estudiadas.

En el caso del ensayo realizado con fracción microsomal, la media de revertantes ha disminuido con respecto al experimento anterior, así como también los índices de supervivencia. A pesar de lo anterior la muestra número 3 presentó un índice de mutagenicidad de 1.63, lo que indica "ligera mutagenicidad"; para las dos muestras anteriores dicho índice recibió la calificación de "no mutagenicidad".

El análisis estadístico para el ensayo con fracción S9+ fue significativo.

Tanto los controles positivos (Tabla II), como los índices de supervivencia bacteriana (Tabla III), estuvieron dentro del rango de la normalidad.

ENSAYO 4 CEPA WP2

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	58 50 62	56.0	1.27	N.M.	45 42 46	44.3	1.00	N.M.
2	68 70 61	66.0	1.50	L.M.	64 57 56	59.0	1.32	N.M.
3	75 76 80	77.0	1.75	L.M.	78 69 69	72.0	1.61	L.M.
DMSO	40 44 48	44.0		N.M.	39 47 43	44.6		N.M.
ME	18 22 20	20.0			23 18 15	18.6		

ANOVA

F = 29.813 p = 0.0000

F = 23.623 p = 0.0000

TABLA VI. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA WP2

2.2 CEPA WP2 *uvrA*

2.2.1 ENSAYO 1

En la Tabla VII se exponen los resultados del test, con la cepa WP2 *uvrA* en los dos ensayos paralelos, con y sin fracción S9+.

En el experimento sin S9+, con la muestra 3 se obtuvo el mayor número de revertantes inducidos, siguiendo por orden decreciente las cepas 2 y 1.

En cuanto a los índices de mutagenicidad, se alcanzaron valores correspondientes a "ligera mutagenicidad" con las muestras 2 y 3 (índices de mutagenicidad de 1.57 y 1.76 respectivamente). La muestra 1 fue calificada de no mutagenicidad, ya que presentó un índice de 1.05.

Se calculó del ANOVA para comprobar si las diferencias encontradas entre el número de revertantes y las distintas concentraciones de las muestras problema estaban relacionadas, y dicho análisis resultó ser significativo.

En el estudio con la fracción S9+, la media de las revertantes aumentó con la concentración de las muestras. De igual forma respondieron los índices de mutagenicidad, que resultaron ser 0.98, 1.24 y 1.52 para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Por tanto, en este caso solo se alcanzó la cualidad de "ligera mutagenicidad" para la muestra 3.

El análisis de la varianza para el ensayo con fracción S9 +, resultó significativo de lo que se deduce que existe una relación directa entre el número de revertantes y el progresivo aumento de las concentraciones de las muestras.

Asimismo, en la Tabla VII, se expresan los resultados del control negativo (M.E.) y del control con disolvente (DMSO), estando ambos dentro del rango normal para la cepa de ensayo.

Los controles positivos se llevaron a cabo con N-metil-N-nitroso-guanidina para la mutación sin S9+ y con 2-Aminoantraceno para el experimento con fracción S9+.

ENSAYO 1 CEPA WP2 *uvrA*

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	45 52 52	49.6	1.05	N.M.	55 51 45	50.3	0.98	N.M.
2	69 75 78	74.0	1.57	L.M.	59 69 63	63.6	1.24	N.M.
3	90 85 74	83.0	1.76	L.M.	86 78 69	77.6	1.52	L.M.
DMSO	55 45 41	47.0		N.M.	54 57 42	51.0		N.M.
ME	48 58 49	51.6			59 49 55	54.3		

ANOVA

F = 21.386 p = 0.0001

F = 8.469 p = 0.0038

TABLA VII. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA WP2 *uvrA*

En ambos casos la cepa respondió de forma adecuada como se muestra en la Tabla VIII.

No se detectó toxicidad en ninguno de los experimentos y la medida de la supervivencia bacteriana fue satisfactoria (Tabla IX).

2.2.2 ENSAYO 2

En la Tabla X se recogen los resultados de este ensayo, con y sin fracción microsomal S9.

La media de revertantes aumenta de forma ligera conforme lo hace la concentración de las muestras, por ello en este caso los índices de mutagenicidad están muy cercanos entre si y alcanzan los siguientes valores 1.49, 1.58 y 1.63 para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Podemos deducir a la vista de los resultados que se obtuvo la cualidad de "ligera mutagenicidad" en el caso de las muestras 2 y 3, para la muestra 1 el valor obtenido rozó dicha calificación.

En cuanto al análisis estadístico, continuó la tónica de ensayos anteriores resultando ser significativo, por lo que se puede afirmar que existe una relación estadísticamente significativa entre la variación en el número de colonias y la concentración de las muestras de estudio.

En lo referente al ensayo con fracción microsomal S9+, la media del número de revertantes aumenta de una muestra a otra por orden de numeración, sin embargo los índices de mutagenicidad fueron no mutagénicos en las tres muestras ensayadas, obteniéndose unos valores de 0.81, 1.18 y 1.32 para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente.

Del mismo modo que ocurría en ensayos anteriores, el ANOVA fue estadísticamente significativo para este ensayo con fracción S9.

TABLA VIII. ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO PARA LA CEPA
WP2 *uvrA*⁻

MUTACION SIN S9

PATRON: N-metil-N'nitro-N-nitroso-guanidina ($1 \cdot 10^{-2}$ mg/placa)

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	INDICE DE MUTACION
I-II	637, 679, 705	673,67	34,31	12,03
III-IV	673, 720, 695	696,00	23,51	14,20

MUTACION CON S9

PATRON: 2-Amino antraceno ($1 \cdot 10^{-4}$ mg/placa)

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	INDICE DE MUTACION
I-II	535, 563, 570	556,00	18,52	10,17
III-IV	585, 583, 500	549,33	44,12	12,12

TABLA IX. SUPERVIVENCIA DE LA WP2 *uvrA*⁻

ENSAYO I-II

DILUCION (bacterias/placa)	FRACCION S9 (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/ placa)	MEDIA
10 ⁻⁶	-	-	120, 115, 168	134,33
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	-	162, 153, 137	150,67
10 ⁻⁶	-	10 ⁻¹	135, 115, 103	117,67
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	10 ⁻¹	150, 147, 158	151,67

ENSAYO III-IV

DILUCION (bacterias/placa)	FRACCION S9 (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/ placa)	MEDIA
10 ⁻⁶	-	-	156, 127, 119	134,00
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	-	170, 152, 149	157,00
10 ⁻⁶	-	10 ⁻¹	124, 108, 149	127,00
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	10 ⁻¹	190, 177, 192	186,33

ENSAYO 2 CEPA WP2 uvrA

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	52 55 52	53.0	1.49	N.M.	28 32 33	31.0	0.75	N.M.
2	58 60 50	56.0	1.58	L.M.	44 45 49	46.0	1.11	N.M.
3	65 53 56	58.0	1.63	L.M.	58 47 48	51.0	1.23	N.M.
DMSO	35 38 34	35.6		N.M.	38 42 37	41.3		N.M.
ME	45 40 48	44.3			41 44 39	39.0		

ANOVA F = 14.259 p = 0.0004 F = 13.225 p = 0.0005

TABLA X. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA WP2 uvrA

En la Tabla VIII se recogen los controles positivos para la cepa en cuestión y en la Tabla IX se presentan los resultados del análisis de supervivencia. En ambos casos la cepa respondió adecuadamente a los mutágenos estándar y no hubo rastro de toxicidad.

2.2.3 ENSAYO 3

En el ensayo sin fracción microsomal tanto la media de revertantes como los índices de mutagenicidad se fueron incrementando conforme al aumento de la concentración de las muestras de estudio (Tabla XI).

Los índices de mutagenicidad alcanzaron la calificación de "ligera mutagenicidad" para el caso de la muestra 3, cuyo valor fue de 1.70, en los restantes casos éste índice fue no mutagénico (1.12 y 1.37 para las muestras 1 y 2 respectivamente).

En cuanto al análisis estadístico, el ANOVA resultó ser significativo por lo que se establece una relación directa entre el aumento en el número de colonias y el de la concentración de la muestra.

Respecto al ensayo con S9+, también se produce un incremento del número de revertantes por placa conforme aumenta la concentración de las muestras, en cambio, los tres índices de mutagenicidad, si bien son progresivos en aumento, fueron no mutagenicos en las tres muestras, alcanzando valores de 0.81 para la muestra 1, 0.96 para la muestra 2 y 1.42 para la muestra 3.

El análisis estadístico para el ensayo con S9+ resultó ser significativo, es decir, habría relación directa entre el número de revertantes y la concentración de las muestras.

Respecto a los controles positivos (Tabla VIII) y el análisis de supervivencia (Tabla IX), estaban ambos dentro del rango de normalidad para la cepa estudiada.

ENSAYO 3 CEPA WP2 uvrA

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	40 47 36	41.0	1.12	N.M.	32 40 39	37.0	0.81	N.M.
2	55 46 50	50.3	1.37	N.M.	50 42 39	43.6	0.96	N.M.
3	65 64 58	62.3	1.70	L.M.	70 65 60	65.0	1.43	N.M.
DMSO	33 37 40	36.6		N.M.	43 49 44	45.3		N.M.
ME	40 35 44	39.6			39 35 30	34.6		

ANOVA

F = 16.695 p = 0.0002

F = 20.067 p = 0.0001

TABLA XI. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA WP2 uvrA

2.2.4 ENSAYO 4

Los resultados obtenidos en este ensayo vienen reflejados en la Tabla XII, observándose en el experimento con S9+ como el número de revertantes es menor en la muestra 1, siendo muy similar en las muestras 2 y 3. En lo que se refiere a los índices de mutagenicidad, fueron aumentando progresivamente, siendo calificadas las muestras 2 y 3 de "ligera mutación" (índices de mutagenicidad de 1.53 y 1.67 respectivamente). En el caso de la muestra 1 este índice resultó ser no mutagénico (0.93).

El ANOVA fue igualmente significativo, estableciéndose una relación directa entre el aumento en el número de colonias y la concentración de las muestras ensayadas.

En el ensayo con activación metabólica, se ve un aumento progresivo tanto en el número de revertantes inducidos por placa como en los índices de mutagenicidad conforme aumenta la concentración, siendo estos de 1.52 para la muestra 3, es decir, alcanzando el calificativo de "ligera mutagenicidad", y de 0.76 y 1.38 para las muestras 1 y 2 respectivamente, siendo por tanto en estos casos no mutagenicos.

El análisis de la varianza resultó ser significativo, confirmando que las diferentes concentraciones influyen en el número de revertantes.

El control positivo se realizó con N-metil-N-nitroso-guanidina para la mutación sin S9+ y con 2-Aminoantraceno para la mutación cons S9+, ambos están recogidos en la Tabla VIII.

El control de supervivencia de la cepa fue correcto como se detalla en la Tabla IX.

2.3 CEPA WP2 uvrA pKM101

2.3.1 ENSAYO 1

En el ensayo 1 sin S9, cuyos resultados se describen en la Tabla XIII, se observa un ligero incremento del número de revertantes por placa en las muestras 2 y 3 respecto a la 1 y los controles.

ENSAYO 4 CEPA WP2 *uvrA*

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	30 28 28	32.0	0.92	N.M.	28 23 24	25.0	0.76	N.M.
2	58 53 48	53.0	1.53	L.M.	48 43 44	45.0	1.38	N.M.
3	65 55 54	58.0	1.67	L.M.	48 47 53	49.5	1.52	L.M.
DMSO	29 38 37	34.6		N.M.	33 35 30	32.6		N.M.
ME	24 28 21	17.6			30 26 38	31.3		

ANOVA

$F = 24.575$ $p = 0.0000$

$F = 22.635$ $p = 0.0001$

TABLA XII. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA WP2 *uvrA*

ENSAYO 1 CEPA WP2 *uvrA* pKM101

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	23 26 18	22.3	1.11	N.M.	23 18 22	21.0	0.77	N.M.
2	30 28 35	31.0	1.55	L.M.	25 30 26	27.0	1.00	N.M.
3	38 40 30	36.0	1.80	L.M.	50 39 46	45.0	1.66	L.M.
DMSO	21 20 19	20.0		N.M.	24 24 33	27.0		N.M.
ME	20 22 29	23.6			23 34 27	28.0		

ANOVA

F = 8.279 p = 0.0032

F = 11.913 p = 0.0008

TABLA XIII. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA WP2 *uvrA* pKM101

Asimismo, los índices de mutagenicidad se incrementan como ocurría con el número de revertante, en las muestras 2 y 3, alcanzando en ambos casos niveles de "ligera mutagenicidad" (1.55 para la muestra 2 y 1.80 para la muestra 3). En este último caso se roza la cualidad de "mutagenicidad positiva", según la regla de las dos veces empleada en nuestro estudio.

En cuanto al análisis estadístico, se calculó el ANOVA el cual resultó ser significativo, con lo que se puede afirmar que las variaciones en el número de revertantes sean debidas a las diferentes concentraciones de las muestras problema, debido a las diferentes concentraciones de agua de las que procede cada una de ellas.

En el estudio paralelo con incorporación de la fracción microsomal (S9+), se observó el mismo comportamiento en cuanto al número de revertantes por placa que en el caso anterior, siendo similares en las muestras 1 y 2 con respecto al ensayo sin S9+ y apreciándose un aumento considerable en el número de ellas en el caso de la muestra 3. El índice de mutagenicidad fue de 1.66 para la muestra 3, siendo de 0.77 y 1 para las muestras 1 y 2 respectivamente.

El ANOVA de este ensayo también fue significativo por lo que si se puede establecer relación directa entre el número de revertantes y el aumento en las concentraciones de las muestras al añadir la fracción S9+.

Por ello podemos afirmar que:

1. Las diferentes concentraciones de las tres muestras influyen significativamente en el número de revertantes
2. La presencia de fracción microsomal también influye significativamente en el caso del número de revertantes

Asimismo, en la Tabla XIII se recogen los resultados obtenidos con el control negativo (M.E.) y el control con disolvente (DMSO), estando ambos en los rangos de

normalidad de la cepa que se estudia.

El control positivo se realizó con Metil-metano-sulfonato para la mutación sin S9+ y con el 2-aminoantraceno para la mutación con S9+. En la Tabla XIV se especifican los resultados obtenidos con dichos mutágenos estándar. La cepa respondió adecuadamente a los mismos, ya que como puede verse el número de revertantes inducidos por el agente empleado como control positivo, duplica al menos la media esperada de mutación espontánea.

No apareció efecto tóxico alguno con ninguna de las muestras ensayadas y el análisis de supervivencia que se efectuó paralelamente fue asimismo adecuado (Tabla XV).

2.3.2 ENSAYO 2

A la vista de los resultados obtenidos en el ensayo 2 que vienen recogidos en la Tabla XVI, se aprecia un incremento del número de revertantes por placa en las muestras 2 y 3 respecto a la muestra 1 y los controles.

De igual modo, los índices de mutagenicidad se incrementaron como ocurre con el número de revertantes en las muestras 2 y 3 alcanzando valores de 1.6 y 1.77 respectivamente, lo cual se relaciona con la característica de "ligera mutagenicidad". En este caso la muestra 1 presenta un índice de mutagenicidad de 1.54, por tanto rozando también el nivel de "ligera mutagenicidad" siguiendo como patrón la regla de las dos veces empleada en nuestro estudio.

En cuanto al análisis estadístico, se calculó el ANOVA apreciándose como en el caso anterior un resultado estadísticamente significativo el cual refleja la relación directa entre las variaciones en el número de revertantes y las diferentes concentraciones de las muestras problema.

En el estudio paralelo con incorporación de la fracción microsomal S9+, se observó que el número de revertantes también va en aumento según se incrementa la concentración

TABLA XIV. ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO PARA LA CEPA
WP2 *uvrA*⁻ pKM 101

MUTACION SIN S9

PATRON: N-metil-N'nitro-N-nitroso-guanidina ($1 \cdot 10^{-2}$ mg/placa)

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	INDICE DE MUTACION
I-II	845, 879, 807	843,67	36,02	4,59
III-IV	875, 824, 860	853,00	26,21	4,94

MUTACION CON S9

PATRON: 2-Amino antraceno ($1 \cdot 10^{-4}$ mg/placa)

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	INDICE DE MUTACION
I-II	845, 800, 849	831,33	27,21	5,13
III-IV	830, 900, 850	860,00	36,05	4,79

TABLA XV. SUPERVIVENCIA DE LA CEPA WP2 *uvrA*⁻ pKM 101

ENSAYO I-II

DILUCION bacterias/placa	FRACCION S9 (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/ placa)	MEDIA
10 ⁻⁶	-	-	104, 102, 101	102,33
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	-	112, 121, 117	116,67
10 ⁻⁶	-	10 ⁻¹	102, 103, 108	104,33
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	10 ⁻¹	119, 114, 122	118,33

ENSAYO III-IV

DILUCION bacterias/placa	FRACCION S9 (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/ placa)	MEDIA
10 ⁻⁶	-	-	183, 192, 179	184,67
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	-	193, 184, 196	191,00
10 ⁻⁶	-	10 ⁻¹	135, 193, 152	160,00
10 ⁻⁶	5.10 ⁻¹	10 ⁻¹	188, 192, 197	192,33

ENSAYO 2 CEPA WP2 uvrA pKM101

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	45 37 51	44.3	1.54	N.M.	33 27 36	32.0	0.96	N.M.
2	45 50 43	46.0	1.60	L.M.	40 38 39	39.0	1.17	N.M.
3	48 49 55	50.6	1.77	L.M.	60 49 47	52.0	1.56	L.M.
DMSO	29 25 32	28.6		N.M.	34 38 28	33.3		N.M.
ME	40 39 42	40.6			38 42 32	37.3		

ANOVA

F = 11.093 p = 0.0011

F = 7.784 p = 0.0041

TABLA XVI. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA WP2 uvrA pKM101

de las muestras, sin embargo, los índices de mutagenicidad, aunque presentan un incremento progresivo en las tres muestras, son menores que en el caso anterior, resultando valores que rozan la cualidad de "ligera mutagenicidad" sólo en el caso de la muestra 3 (índice de mutagenicidad = 1.54), ya que en las muestras 1 y 2 éste fue de 0.96 y 1.18 respectivamente.

El ANOVA de éste ensayo resultó también ser significativo, lo que conlleva a deducir que existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de revertantes y las concentraciones de las muestras al realizar el ensayo en presencia de la fracción S9+.

Podemos concluir diciendo como en el ensayo anterior que:

1. Las concentraciones de las muestras influyen significativamente en el número de revertantes e indirectamente sobre el índice de mutagenicidad.
2. La presencia de la fracción microsomal influye de manera significativa en el número de revertantes inducidos según aumenta la concentración de las muestras problema

En la Tabla XIV se recogen los resultados de los controles con el mutágeno estándar, en nuestro caso Metil-metano-sulfonato para la mutación sin S9+ y 2-Aminoantraceno para el experimento con S9+. En ambos casos la cepa respondió de forma correcta a los mismos.

El análisis de supervivencia (Tabla XV) resultó asimismo adecuado y no se detectó efecto tóxico alguno en ninguna de las muestras.

2.3.3 ENSAYO 3

En el ensayo sin fracción S9+, se observa un mayor número de revertantes de las muestras 2 y 3, las cuales se corresponden con las mayores tasas de concentrados del agua problema (Tabla XVII).

ENSAYO 3 CEPA WP2 uvrA pKM101

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	38 42 46	42.0	1.34	N.M.	40 30 35	35.0	0.81	N.M.
2	55 46 50	50.3	1.60	L.M.	42 50 39	43.6	1.01	N.M.
3	63 58 49	56.6	1.81	L.M.	71 70 65	68.6	1.60	L.M.
DMSO	30 35 29	31.3		N.M.	42 48 39	43.0		N.M.
ME	35 28 42	35.0			37 27 25	23.0		

ANOVA

F = 11.344 p = 0.0010

F = 25.846 p = 0.0000

TABLA XVII. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA WP2 uvrA pKM101

En lo referente a los índices de mutagenicidad observamos valores correspondientes a la cualidad de "ligera mutagenicidad" en el caso de las muestras 2 y 3, con unos índices de mutagenicidad de 1.60 y 1.81 respectivamente. Para la muestra 1 el índice fue de 1.34, considerándolo por tanto no mutagénico.

Siguiendo con la tónica de anteriores ensayos, el análisis de la varianza resultó ser significativo, al alcanzarse la significación estadística, por lo que se puede establecer la relación entre el aumento del número de colonias y las concentraciones de las muestras ensayadas.

En el ensayo realizado añadiendo la fracción microsomal S9+, el número de revertantes fue aumentando en relación a las muestras ensayadas. En este caso, los índices de mutagenicidad, también se incrementaron progresivamente conforme a lo hacen las concentraciones de las muestras de ensayo, aunque con valores inferiores a los del ensayo sin fracción S9+, sin embargo si se alcanzó el nivel de "ligera mutagenicidad" para la muestra 3 (índice de mutagenicidad de 1.60).

El análisis estadístico al realizar el análisis de la varianza fue igualmente significativo en el ensayo con fracción S9+, es decir, existe relación estadísticamente significativa entre el aumento del número de revertantes y el incremento en las concentraciones de las muestras estudiadas.

En la Tabla XIV se exponen los resultados de los controles positivos, tanto para el ensayo sin S9+ como para el ensayo con fracción microsomal. La respuesta de la cepa en ambos casos estuvo dentro de los límites aceptables.

El análisis de la supervivencia viene recogido en la Tabla XV, no apreciándose efecto tóxico alguno.

2.3.4 ENSAYO 4

Los resultados de éste ensayo vienen recogidos en la Tabla XVIII.

En el ensayo sin S9+, el número de revertantes y la media de los mismos, se van incrementando conforme también aumentan las concentraciones de las muestras de estudio. En este caso se alcanzaron valores de "ligera mutagenicidad" para las muestras 2 y 3, las cuales mostraron unos índices de mutagenicidad de 1.6 y 1.82 respectivamente.

El ANOVA también fue significativo en este caso, por lo que podemos afirmar que las variaciones en el número de revertantes tienen relación con las distintas concentraciones ensayadas.

En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo realizado con fracción S9+, se aprecia similar comportamiento al del caso anterior, con un incremento progresivo en los valores de los índices de mutagenicidad según aumenta la concentración de las muestras, correspondiendo unas cifras de 0.96, 1.40 y 1.61 para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Se observa asimismo que a la muestra 3, la de mayor concentración, le corresponde la calificación de "ligera mutagenicidad".

El exámen estadístico del estudio con fracción S9+, también fue significativo concluyendo por tanto una relación directa entre el número de revertantes y las concentraciones de las muestras ensayadas.

Tanto los controles positivos (Tabla XIV) como los análisis de supervivencia de la bacteria (Tabla XV), resultaron adecuados y no apareció rastro de toxicidad.

En el estudio sin S9+ el número de revertantes presentó un incremento progresivo. En cuanto a los índices de mutagenicidad también fueron en aumento, resultando no mutagénicos para las muestras 1 y 2 (1.03 y 1.23 respectivamente), y para la muestra 3 alcanzó la calificación de "ligera mutagenicidad" al obtenerse un valor de 1.55.

El ANOVA fue estadísticamente significativo para el experimento sin S9+.

ENSAYO 4 CEPA WP2 uvrA pKM101

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	25 30 32	29.0	1.23	N.M.	30 27 28	28.3	0.96	N.M.
2	38 33 43	38.0	1.61	L.M.	35 42 46	41.0	1.40	N.M.
3	45 46 38	43.0	1.82	L.M.	46 50 46	47.3	1.61	L.M.
DMSO	24 20 27	23.6		N.M.	26 30 32	29.3		N.M.
ME	30 32 36	32.6			25 29 20	24.6		

ANOVA

F = 10.862 p = 0.0012

F = 20.178 p = 0.0001

TABLA XVIII. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA WP2 uvrA pKM101

3. RESUMEN DE LA EVALUACION MUTAGENICA

Como resumen de la evaluación mutagénica de los concentrados orgánicos clorados procedentes de aguas de consumo público, podemos destacar los siguientes resultados:

1. En cuanto a las **cepas de estudio**, la más sensible para destacar la mutagenicidad inducida por las muestras problema parece ser la WP2 uvrA pKM101. Las cepas restantes nos ofrecen índices de mutagenicidad menores en todos los ensayos, tal y como viene reflejado en las Tablas XIX y XX, donde se resumen los índices medios de mutagenicidad tanto en presencia como en ausencia de S9+.
2. En cuanto a la **relación número de revertantes/aumento de las concentraciones**, este gradiente se mantiene para todas las cepas del estudio, tanto en el ensayo sin fracción microsomal como en la experiencia con activación metabólica. Esto indica que según aumenta la concentración de los residuos orgánicos en las muestras, se incrementa la reversión inducida. El grado de significación estadística de ésta asociación, que viene dado por el cálculo del ANOVA, corroboró dicha situación.
3. En cuanto a la **fracción S9**, se observa una disminución de la actividad mutagénica en los ensayos con activación enzimática con respecto a los ensayos sin S9. Este hecho es notorio en las tres cepas estudiadas, aunque quizás más en el caso de las cepas WP2 y WP2 uvrA pKM101. El ANOVA de los ensayos realizados con fracción microsomal reflejó una relación directa estadísticamente significativa entre el aumento del número de colonias y las diferentes concentraciones de las muestras.
4. En lo que respecta a la **evaluación mutagénica**, podemos afirmar que ninguna de las muestras de concentrados de aguas de consumo público ensayadas se han mostrado como mutagénicas, al no alcanzar los índices de mutagenicidad el valor 2, necesario para calificar un producto como mutagénico en el test de Escherichia coli, según la "regla de las dos veces".

5. Los **controles positivos** efectuados para cada cepa de ensayo, vienen resumidos en la Tabla XXI, donde se puede comprobar que todas las cepas respondieron adecuadamente. No hubo además rastro de toxicidad en ninguna de las pruebas y las medidas de supervivencia de las bacterias fueron asimismo satisfactorias.

TABLA XIX. INDICES MEDIOS DE MUTACION SIN S9

MUESTRA	C E P A S		
	WP2	WP2 <i>uvrA</i> ⁻	WP2 <i>uvrA</i> ⁻ pKM101
1	1, 07	1,14	1,30
2	1,41	1,51	1,58
3	1,59	1,69	1,80

TABLA XX. INDICES MEDIOS DE MUTACION CON S9

MUESTRA	C E P A S		
	WP2	WP2 <i>uvrA</i> ⁻	WP2 <i>uvrA</i> ⁻ pKM101
1	0,79	0,84	0,87
2	1,19	1,19	1,14
3	1,40	1,44	1,60

TABLA XXI.

INDICES MEDIOS DE MUTACION CON PATRONES POSITIVOS

CEPA	SIN S9	CON S9
WP2	20,77	18,21
WP2 <i>uvrA</i> ⁻	13,11	11,14
WP2 <i>uvrA</i> ⁻ pKM 101	4,76	4,96

V. *DISCUSSION*

1. CLASIFICACION DE LOS TESTS DE MUTAGENICIDAD

Los numerosos ensayos de mutagénesis varían en cuanto a su sensibilidad, complejidad y su habilidad para detectar potenciales carcinógenos.

Los test de mutagenicidad pueden ser clasificados sobre varias bases que incluyen:

- si se realizan *in vivo* o *in vitro*
- si utilizan organismos eucariotas o procariotas
- el tipo de mutación que miden

A. Algunos tests de mutagenicidad se realizan *in vitro* con bacterias, levaduras, hongos o cultivos celulares. Otros tests, como los de la traslocación heredable y los específicos de locus son realizados *in vivo* utilizando mamíferos como organismos de ensayo.

Para nuestra experiencia hemos utilizado un ensayo *in vitro* ya que estos se consideran como los más sencillos y más sensibles (20).

B. Tanto el test de Ames como el de *E. coli* usan como mutantes organismos procariotas.

El material genético de los procariotas tiene diferencias básicas con respecto al material genético de los eucariotas. Estas diferencias entre los dos sistemas pueden tener un impacto sobre el valor predictivo del test a la hora de la detección de carcinógenos.

Debido a que algunos compuestos químicos no son mutagénicos o carcinogénicos por si mismos, requieren sistemas enzimáticos que estén presentes en los organismos huéspedes o bien que sean incorporados al ensayo.

Por su inmediata aplicación al hombre, las investigaciones encaminadas a la detección de mutágenos deberían hacerse con mamíferos, ya sea *in vivo*, ya en sistemas *in vitro*.

Sin embargo, los procariontes y algunos eucariontes inferiores (por ejemplo hongos), resultan de más fácil manejo.

El problema tiene una doble vertiente: si cierto compuesto químico resulta mutágeno al ser ensayado en *Escherichia coli*, parece razonable que las autoridades competentes pongan a dicha sustancia "en cuarentena" como potencial mutágeno en la especie humana, aunque es posible que después no se confirme.

Sin embargo, podría ocurrir, y de hecho ha ocurrido y esto es lo verdaderamente peligroso, que el producto ensayado no resultara mutagénico en la bacteria, siéndolo y mucho en potencia para el hombre.

Por ejemplo, condensados de humo de tabaco resultaban no tener actividad mutágena en cultivos de *Salmonella*. Sin embargo, si se añaden al medio de cultivo extractos de células de pulmón o hígado, entonces resulta que el condensado del humo del tabaco se comporta como un poderoso mutágeno (125).

De cualquier manera, éstos sistemas *in vitro* no mimetizan exactamente los resultados obtenidos en animales, a pesar de la introducción de sistemas de activación microsomal, pero pretenden suplir las reacciones enzimáticas que tienen lugar en ellos.

C) Según el ensayo de mutagenicidad se detectan distintos tipos de daño genético (126).

Los tipos de daño genético se establecen en dos categorías básicas: mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas (2).

Los sistemas de mutagénesis bacteriana como el test de Ames y el de *E. Coli* detectan sólo mutaciones genéticas; otros ensayos como el de la traslocación heredable detectan solamente aberraciones cromosómicas; algunos sistemas como uno que emplea *Drosophila* son capaces de detectar ambos tipos de daño genético (20).

Debido a que el proceso inicial de la carcinogénesis inducida por productos químicos es una mutación genética (18), el ensayo elegido por nosotros para el estudio de mutagenicidad de concentrados orgánicos en agua de bebida es teóricamente uno de los que imitan más de cerca los procesos de iniciación de la carcinogénesis (20).

1.1 APLICACIONES DE LOS TESTS DE MUTAGENICIDAD

La predicción de la carcinogenicidad de manera rápida y económica tiene varios usos, los cuales incluyen:

- Cribado de productos ambientales con potencial efecto carcinógeno (127).
- Identificación de posibles carcinógenos en fluidos corporales (128).
- Comprensión de los mecanismos de activación de carcinógenos químicos y su reacción con el ADN (129, 130).
- Análisis de compuestos químicos sintéticos.

De las aplicaciones anteriormente enumeradas, la que tiene mayor interés es el despistaje de productos químicos para descartar su posible carcinogenicidad.

Dentro de los compuestos químicos que tienen importancia hoy día por su posible trascendencia para la salud de los seres vivos, hemos elegido para llevar a cabo nuestro estudio aquellos que se forman como resultado de la reacción del cloro utilizado para la desinfección del agua con la materia orgánica que contiene ésta.

Las condiciones bajo las cuales se realizan éstos tests son muy exigentes y la interpretación de los mismos es dificultosa.

1.2 VALIDACION DE LOS TESTS DE MUTAGENICIDAD

Los estudios de validación de los tests de carcinogenicidad se realizan a través del exámen de diversas series de compuestos, algunos de los cuales son carcinógenos conocidos y otros no.

Los resultados de éstos estudios de validación nos dan una idea aproximada de lo efectivo que será el test a la hora de predecir la actividad carcinogénica de un determinado compuesto químico.

Los tres índices más comunes para expresar el rendimiento de un ensayo son sensibilidad, especificidad y valor predictivo.

Estos términos deben ser usados con precaución a la hora de comparar dos sistemas en diferentes estudios de validación o cuando se va a predecir el rendimiento de un test ante una serie de compuestos químicos nuevos.

1.2.1 CRITERIOS PARA UNA VALIDACION EFECTIVA

A la hora de diseñar e interpretar los resultados obtenidos de un ensayo de mutagenicidad, la experiencia sugiere que a nivel general debe prestarse atención especial a los siguientes criterios:

A. Consideración del producto químico como carcinógeno o no carcinógeno.

Esta decisión es bastante dificultosa en base a los estudios de carcinogenicidad en animales. De cualquier modo, la definición de no-carcinogenicidad o débil carcinogenicidad es más complicada que la determinación del producto como carcinógeno.

La ausencia de un efecto es difícil de demostrar y la afirmación más precisa es que "dentro de un sistema particular no se observó efecto carcinogénico".

De cualquier modo, hay ejemplos de químicos en los cuales se ha obtenido un resultado negativo para carcinogenicidad en estudios con animales y posteriormente mostraron ser positivos en los tests predictivos. Si se volvía a analizar el producto químico en un estudio animal más riguroso mostraba entonces ser carcinógeno.

De ésto se deduce que es muy importante valorar la carcinogenicidad de forma cuidadosa.

El mejor método para lograr este objetivo es revisar los datos por un grupo de expertos y convenir en una clasificación. El único estudio de validación que emplea ésta técnica es el Estudio de Colaboración Internacional (32).

También pueden seguirse las recomendaciones de la IARC o EPA descritas en este sentido (131).

- B. El estudio deberá ser codificado.

Se logrará una valoración más objetiva del rendimiento del test si el investigador no conoce las consecuencias esperadas sobre los resultados del mismo.

- C. Se deberá hacer constar un resultado claramente positivo o negativo. Los resultados dudosos no pueden ser resueltos para quitar rendimiento al test.

- D. Los compuestos químicos empleados en el estudio de validación serán de elevada y conocida pureza, y se tendrá en cuenta la comparación con los datos obtenidos de otros estudios de carcinogenicidad.

- E. Los compuestos a ser analizados cubrirán un amplio espectro de clases de productos químicos. Para conseguir éste objetivo con relativos pocos productos, se pueden usar pares de compuestos de la misma clase de químico, uno de los cuales es carcinógeno y el otro no (132).

- F. Cuanto mayor sea el número de compuestos químicos a estudiar, mayor será la base de datos obtenida.

- G. Es importante a la hora de validar un test realizar colaboraciones entre distintos laboratorios de prestigio para evaluar la variabilidad debida a ésta causa.

Nosotros hemos tenido como laboratorio de referencia en este sentido al Departamento de Toxicología y Nutrición del Centro Nacional de Investigación y Nutrición de Majadahonda (Instituto de Salud Carlos III).

1.2.2 ESTADIOS EN LA VALIDACION

En los pasados años un amplio número de tests han sido desarrollados y usados, identificándose en una reciente revisión más de 100 ensayos (133).

El uso de tests predictivos no estaría basado únicamente en el establecimiento de hipótesis acerca de los mecanismos moleculares de la inducción del cáncer y la mutación, sino que la selección de los mismos debe hacerse en base a su capacidad para predecir la carcinogenicidad.

El desarrollo de un test hasta que está completamente establecido como test predictivo evoluciona en una serie de etapas. Dichos estadios son:

- A. Estadio 1: Test en desarrollo. En ésta etapa se cree que el test predictivo tiene algún valor y pueden deducirse algunos mecanismos de vínculo con la inducción química del cáncer. Durante ésta etapa han sido analizados entre 10 y 100 compuestos químicos.

En este grupo destacan ciertos tests como el de la inducción de hepatocitos resistentes *in vivo* en la rata, la fragmentación del ADN por elución alcalina, la transformación de células embrionarias de rata infectadas viralmente, la transformación de líneas celulares establecidas, las aberraciones cromosómicas *in vitro* en células de ovario de hamster chino, etc...

- B. Estadio 2: Test desarrollado. El test habrá de ser sometido a un estudio de validación formal donde se analicen más de 100 compuestos químicos de diversas clases.

En este estadio se considera que un test esta preparado para ser usado como ensayo de carcinogenicidad siempre que demuestre ventajas adicionales o complementarias sobre los tests existentes.

Dentro de éste grupo se incluyen aquéllos que detectan reparaciones en el ADN bacteriano (en *E. coli* y *B. subtilis*), recombinación mitótica en *S. cerevisiae* D3, transformación en cultivos embrionarios primarios de hamster, ensayo letal recesivo en *Drosophila*, ensayo letal dominante en ratón, etc...

- C. Estadio 3: Test predictivo establecido. Los tests en éste estadio están en uso en un amplio número de laboratorios y un gran número de sustancias químicas, idealmente más de 1000, ya han sido analizadas.

Hasta el momento actual se han validado adecuadamente dos tests en este grupo, el ensayo microsomal en *Salmonella typhimurium* y el test de *Escherichia coli* WP2 (1).

1.3 CARACTERISTICAS DE LOS TESTS EMPLEADOS EN NUESTRO ESTUDIO

Uno de los problemas de los tests a corto plazo es la elección del ensayo más sensible y mejor validado dentro de las categorías de estudios que detectan mutaciones genéticas.

De esta manera, el comité de expertos bajo la denominación de OECD (1980) (117), sugirió que los compuestos deben ser analizados en células procariotas tanto en *Salmonella* (incluyendo las cepas TA 100, TA 98, 1535, 1538) como en *Escherichia coli* (empleando las cepas WP2, WP2 uvrA⁻, WP2 uvrA⁻ pKM 101).

Para llevar a cabo nuestro ensayo hemos empleado el Test de *Escherichia coli*, tomando como referencia para nuestros resultados el Test de Ames que se basa en la utilización de una cepa de *Salmonella typhimurium*, al ser este el ensayo más validado por numerosos laboratorios y del que se disponen más datos (11, 12).

Ambos tipos de tests pertenecen al estadio 3, según el cual se trata de ensayos perfectamente establecidos, por esta razón se recomienda utilizar el test de *Escherichia coli*

en tandem con el test de *Salmonella* (32).

Por otro lado, el apoyarse en un sólo ensayo podría generar un aumento en el número de falsos positivos y negativos. De ello se deduce que el Food Safety Council (1980) (32), sugiera la aplicación de una batería de ensayos como método para limitar la incidencia de resultados que pudieran llevar a confusión.

Seguidamente se describe someramente las propiedades del test.

El sistema de ensayo que utiliza *Escherichia coli* como organismo indicador (38) ha sido hasta ahora menos empleado que el ensayo microsomal con *Salmonella tiphymurium*.

De cualquier manera, es muy similar en concepto al ensayo con *Salmonella* y tiene rendimiento útil, características que permiten clasificarlo como un test establecido.

La sensibilidad del test de *Escherichia coli* en el estudio realizado por Dyrby y Ingvarsen (1983) (134) fue del 91% y va completamente pareja con la sensibilidad obtenida en el mismo estudio para el test de *Salmonella* (72%).

Esto último diverge de las informaciones aportadas por Brusick et al. (1980) (39), y esta diferencia puede deberse a las nuevas cepas portadoras de plásmidos.

Si comparamos los ensayos de mutagenicidad usando *Salmonella* y *E. Coli* WP2 llevados a cabo en dos laboratorios (135, 136), se obtuvieron similares resultados.

Dos laboratorios usaron éste ensayo en el Programa Internacional (32), y los valores de sensibilidad y especificidad fueron similares a aquéllos producidos por el ensayo microsomal con *Salmonella*: el rango de valores para sensibilidad osciló entre 55-73% y para especificidad varió entre 59-81% (135, 32).

Una ventaja adicional del sistema que utiliza *E. coli* es su capacidad para detectar carcinógenos metálicos (137).

Entre sus desventajas podemos hacer mención de dos circunstancias:

- La pared celular es una barrera para moléculas grandes que podrían producir mutación si pudieran reaccionar con el ADN.
- La especificidad en el mecanismo de reversión está orientada a mutágenos que causan sustitución de pares de bases; algunos agentes que actúan solamente como mutágenos "frameshift" no serían detectados.

Asimismo, la precisión alcanzada en la identificación correcta de carcinógenos, ha llevado a algunos investigadores a sugerir la idea de que la potencia mutagénica de éstos dos tipos de tests estaría correlacionada con la potencia carcinogénica (138, 139).

A pesar del amplio uso de éstos tests existen limitaciones a la hora de interpretar los resultados obtenidos en ellos, dichas limitaciones incluyen:

1.3.1 FALSOS NEGATIVOS

Numerosos factores pueden ser responsables de falsos negativos en los tests bacterianos analizados:

A. Estructura química de la sustancia a analizar.

El tipo de compuesto químico objeto de ensayo tiene gran importancia en la sensibilidad de la técnica de mutagénesis.

El test de Ames y el de *E. coli* han sido propuestos como métodos eficientes para determinar el potencial carcinógeno de algunos químicos (138, 140).

Se han llevado a cabo siete grandes estudios (27, 138, 135, 29, 141, 142, 143) con el fin de evaluar el valor predictivo de los dos test mencionados a la hora de detectar carcinógenos.

No hemos encontrado en la bibliografía consultada ningún estudio que nos muestre la sensibilidad del test de *Escherichia coli* frente a los mutágenos contenidos en un agua

de consumo público.

B. Toxicidad de la sustancia a estudiar

Algunos compuestos químicos pueden ejercer acción bactericida sobre los organismos de ensayo, pudiendo falsear el resultado (29). Un buen ejemplo de este problema son los antibióticos.

Para evitar este posible error hemos llevado a cabo, paralelamente con el test de *Escherichia coli*, ensayos de supervivencia bacteriana, comprobando que ninguna de las muestras a las concentraciones estudiadas por nosotros disminuye el número de bacterias viables por placa de modo significativo.

C. Naturaleza del sistema de activación metabólica *in vitro*

El sistema de activación más usado consiste en una fracción de microsoma-citosol de hígado de rata o fracción S9 (123) que contiene algunos de los enzimas de activación y/o detoxificación necesarios, pero no todos los que están presentes en el sistema animal (144).

De lo anterior se deduce que los sistemas activados no siempre mimetizan las reacciones que tienen lugar en animales intactos (134).

De cualquier forma un número de factores podrían afectar la capacidad del sistema de activación para reproducir el metabolismo *in vivo*. Estos factores incluyen:

- la especie animal de la cual se obtiene el sistema de activación
- el tejido fuente del sistema de activación
- el uso de un agente inductor
- el tipo de agente inductor
- el uso de potenciadores

- la presencia de inhibidores de la mutagénesis

La capacidad de activación de la fracción S9 de hígado puede depender de la especie animal de la que se obtiene el hígado (145), debido a que existen grandes diferencias entre distintas especies animales a la hora de metabolizar compuestos (151).

Por ejemplo, la activación del producto de la pirólisis del triptófano, Trp-P-2, con fracción S9 de hígado de hamster, es 370 veces mayor que con fracción S9 de hígado de mono y 30 veces mayor que con fracción S9 de hígado de rata cuando son comparadas con fracciones de hígado no activadas (145).

En varios casos, el uso de cultivos de hepatocitos primarios como sistema de activación ha mostrado tener ventajas sobre la fracción S9 (146, 147, 148).

Según se utilizara una u otra forma de activación, al final se obtendrían metabolitos diferentes, con lo que cada situación podría dar resultados engañosos bajo parecidas circunstancias.

Además del sistema S9 y de los sistemas de células de mamíferos, se han utilizado fracciones subcelulares de plantas, núcleos de células de mamíferos aislados, extractos de células de flora anaeróbica predominantemente intestinal, hígado aislado perfundido, etc...

El tejido fuente para el sistema de activación puede ser también un factor importante, debido a que aparte del hígado existen otros órganos como el pulmón, el riñón y el intestino que también tienen capacidad para metabolizar carcinógenos y mutágenos.

Partiendo de que la administración oral es la ruta para la ingestión de alimentos, el poder de activación del tracto gastrointestinal puede tener considerable relevancia (149).

Determinados agentes inductores juegan un papel vital en la activación de mutágenos *in vivo*; de manera que el pretratamiento de los animales con un agente de éstas características incrementa la capacidad de activación del sistema *in vitro* (123, 145).

El más popular agente inductor es el Aroclor 1254, que es una mezcla de bifenilos policlorados (PCB) (123).

También se han empleado otros agentes inductores incluyendo fenobarbital, 3-metilcolantreno, y una inducción secuencial de fenobarbital y beta-naftoflavona (123, 150).

La inducción con PCB es preferida debido a que es un inductor de amplio espectro.

El sistema fenobarbital-beta-naftoflavona es igualmente efectivo y posiblemente un sustituto seguro del anterior (150).

Varios comutágenos han sido identificados en años recientes; éstas sustancias no son mutagénicas en si mismas, sino que se comportan en casos concretos como potenciadores o debilitadores de la posible mutagenicidad de otras sustancias. Así por ejemplo, el azobenceno potencia la mutagenicidad del 4-dimetilaminobenceno (132).

D. Inadecuado sistema de transporte de membrana

El transporte a través de la membrana celular puede ser otro factor responsable de falsos negativos ya que puede diferir según se trate de bacterias o de células de mamífero.

Así, por ejemplo, la Actinomicina D, es negativa en el test de Ames (141) presumiblemente porque no es transportada a través de la membrana bacteriana (30).

E. Incapacidad para detectar aberraciones cromosómicas

En algunos casos, la forma activada de la sustancia a estudiar podría ser demasiado lábil para alcanzar la concentración necesaria como para permitir la difusión dentro de la bacteria.

Un ejemplo del caso anterior podría ser la griseofulvina, un conocido carcinógeno, que causa disfunción en el aparato mitótico, un proceso mutagénico y presumiblemente carcinogénico que no puede ser detectado en células microbianas. La griseofulvina es negativa en el test de Ames (141).

1.3.2 FALSOS POSITIVOS

Se han hecho estudios referidos a la posible carcinogenicidad relacionada con mutágenos vehiculados por los alimentos.

Fukuoka (126), mostró que los mutágenos flavonoides procedentes de malas hierbas de enebro eran carcinogénicas para ratas, indicando que esas sustancias pueden ser negativas en los tests bacterianos.

Thompson (151), ha recopilado datos de respuestas citogenéticas *in vitro* vs. *in vivo* de 216 químicos.

El análisis de los datos confirma que una respuesta negativa *in vitro* es altamente predictiva *in vivo*; de cualquier modo, una respuesta positiva *in vitro* es predictiva de un resultado positivo *in vivo* solamente para cerca de la mitad de los químicos analizados.

Existen evidencias que los productos derivados de la pirólisis del triptófano pueden ser carcinógenos, concretamente el Trp-P-2 induce la transformación *in vivo* de células embrionales de hamster y el Trp P-1 induce fibrosarcoma en el mismo animal cuando se administra subcutáneamente (152), y ambos Trp-P-1 y Trp-P-2 inducen la formación de enzimas alterados en hígado de rata cuando se administran intraperitonealmente (153), lo cual es un signo temprano de hepatocarcinogénesis.

De cualquier manera Trp P-1 y Trp P-2 son inactivados por deaminación en presencia de nitritos bajo condiciones fisiológicamente parecidas a las condiciones ácidas del estómago.

Consecuentemente, los productos derivados de la pirólisis del triptófano pueden no ser carcinógenos cuando se administran vía oral.

Varios factores pueden ser responsables de la incidencia de falsos positivos en los tests bacterianos incluyendo:

A. **ACTIVACION BACTERIANA** de compuestos químicos

Si la bacteria empleada tiene enzimas capaces de metabolizar el compuesto químico a una forma activa y si estos enzimas no están presentes en mamíferos, se puede generar un resultado falso positivo (140).

Este problema lo hemos solventado en nuestro ensayo al emplear *Escherichia coli*, microorganismo presente en la flora intestinal de los mamíferos.

B. La **AUSENCIA DE CAPACIDAD PARA REPARAR** el ADN, como sucede con la *Salmonella* y el *E. coli*, puede contribuir a la incidencia de falsos positivos, aunque no se pueden identificar ejemplos específicos.

C. Presencia de **IMPUREZAS MUTAGENICAS** obviamente podrían generar falsos positivos; así, en la sacarina se encontraron hasta doce tipos de impurezas. Dicho producto en su forma purificada no ha sido mutagénico en los tests bacterianos (154).

En nuestro caso, las muestras no han sido purificadas, ya que lo que se pretende es evaluar la posible actividad mutagénica globalmente considerada de los concentrados de agua de bebida.

D. **LIMITACIONES EN LA SENSIBILIDAD** de los ensayos de carcinogénesis

En algunos casos los ensayos de mutagenicidad pueden no ser lo suficientemente sensibles como para detectar potenciales carcinógenos que son identificados como mutágenos en los tests bacterianos (20).

Esta situación podría dar lugar a un aumento en los falsos positivos que realmente no serían falsos.

Según McCann y Ames (140), algunos de éstos falsos positivos corresponderían a mutágenos débiles, incluso otros mas potentes están incluidos en la categoría de falsos positivos cuando la evidencia de mutagenicidad no es contundente.

E. Exclusión de importantes **MECANISMOS DE DETOXIFICACION** y protección.

Los tests de mutagenicidad bacterianos pueden excluir importantes mecanismos de detoxificación y protección, que si están presentes en mamíferos.

El efecto del ácido gástrico y del nitrito en los pirolisatos del triptófano podría ser un buen ejemplo.

La acción enzimática de la flora intestinal, las limitaciones impuestas por la ingesta y el transporte a nivel gastrointestinal, las vías de excreción y la detoxificación en tejidos extrahepáticos representan ejemplos claros de mecanismos de defensa que están excluidos en los tests bacterianos y que pueden ser motivos de falsos positivos.

2. **METODOS DE ENSAYO**

El sistema de reversión de *Escherichia coli* trp⁺, puede ser estudiado utilizando el mismo protocolo que el test de Ames, simplemente sustituyendo la fuente de histidina por triptófano (155).

2.1 **ENSAYO DE INCORPORACION EN PLACA**

Es preciso tener en cuenta las relaciones mutagenicidad-toxicidad y mutación espontánea-inducida a la hora de evaluar el resultado obtenido con este procedimiento de ensayo.

En el primer caso, el efecto tóxico que pueden ejercer determinadas concentraciones de un producto químico sobre las bacterias podría enmascarar el efecto mutagénico, sobre todo cuando la acción letal del compuesto sea elevada a concentraciones debilmente mutagénicas; o bien podría inducir a error en la interpretación de resultados, ya que las colonias revertantes crecen sobre un césped de bacterias auxotróficas que aparecen debido a las trazas de triptófano que se añaden al medio, de forma que en el caso de que la concentración ensayada sea tóxica y por tanto produzca una muerte masiva de las bacterias trp⁻, habrá mayor cantidad de triptófano para las supervivientes.

A consecuencia de lo anterior, se producirá mayor división celular y aparecerán colonias pequeñas que pueden confundirse con revertantes inducidas, sin serlo. Por ello es por lo que debe examinarse siempre con atención el césped bacteriano.

En el segundo caso, la relación mutación espontánea-mutación inducida debe tenerse siempre en cuenta.

Hay dos clases de mutantes espontáneos:

- Mutantes preexistentes presentes en la población celular en el momento del plaqueado.
- Mutantes de la placa, las cuales se desarrollan durante el periodo de crecimiento en la misma.

En la práctica casi todos los mutantes espontáneos pertenecen a la segunda categoría.

El número de mutantes de la placa depende del número final de bacterias auxotróficas las cuales crecen en la placa de agar selectivo y por lo tanto son capaces de mutar. Este a su vez, depende del suplemento de triptófano en las placas de agar selectivo y es independiente del número de bacterias plaqueadas.

En cuanto a la cantidad de bacterias plaqueadas los límites se encuentran entre $5 \cdot 10^7$ y $2 \cdot 10^8$, obteniéndose la máxima sensibilidad cuando se plaquean $2 \cdot 10^8$ células.

Se recomienda un número de mutantes espontáneos para la cepa WP2 de $2 \cdot 10^8$ y de $3 \cdot 10^8$ células viables para WP2 *uvrA*⁻ (39).

En lo referente a este punto, hemos seguido las recomendaciones que hacen Green y Muriel (38) en su protocolo.

2.2 ENSAYO DE PREINCUBACION EN PLACA

Esta modificación del ensayo de incorporación en placa fue propuesta por Ames en 1975 y consiste en incubar la bacteria, el mutágeno y la fracción microsomal durante 30 minutos, a 37°C, antes de añadir el agar líquido.

El método es más sensible que el ensayo en placa convencional (145), debido a que el compuesto a ensayar, la bacteria y la fracción microsomal se incuban a una concentración superior, facilitándose así el contacto entre ellos y haciéndose más factible la metabolización del compuesto.

Sin embargo, Ames lo propuso sólo como apoyo al método convencional, ya que aunque existen productos que han sido eficazmente detectados por este método como la dietilnitrosamina, existen otros que no se detectan. Esto puede deberse a que la preincubación requiere un periodo de tiempo (20-30 minutos), durante el cual los enzimas han de estar a 37°C, temperatura a la cual los microsomas pierden su actividad rápidamente, mientras que en el ensayo convencional permanecen activos entre seis y nueve horas, probablemente debido a la estabilización de los enzimas inmovilizados por el agar.

En todo caso, el método de preincubación se considera ventajoso para compuestos que debido a su inestabilidad requieren una rápida metabolización para ejercer su efecto mutagénico.

En este último punto nos basamos para elegir el ensayo convencional en placa en lugar de la preincubación, dado que la literatura consultada sobre el tema (156), nos informaba que la mutagénesis derivada de aguas de bebida cloradas disminuía en presencia de S9 mix en el test de Ames. Por tanto nos pareció más adecuado estudiar los compuestos sin preincubación, para valorar mejor su potencia mutagénica.

Otras posibles formas de realizar el test de *Escherichia coli* serían las siguientes:

- Test de la mancha, en el cual una pequeña cantidad del compuesto a estudiar se plaquea directamente en una placa de agar selectivo. Este método es demasiado insensible para el screening rutinario.
- Tratamiento y test de la placa, donde una cepa es tratada con el agente a analizar y posteriormente plaqueada para determinar supervivencia y frecuencia de revertantes triptófano⁺. Este método es menos sensible que el protocolo de Ames, pero es útil para una medida cuantitativa de la mutación.
- Test de filtro de membrana, donde las bacterias son impresionadas sobre un filtro de membrana el cual es transferido a un agar que contiene el agente a estudiar, y posteriormente a agar selectivo donde las colonias triptófano⁺ se pueden almacenar en el propio filtro. Este método es probablemente el más óptimo para determinar agentes tóxicos que afectan al crecimiento bacteriano, pero es difícil de ejecutar como procedimiento de rutina.
- Test de Fluctuación, en el cual se mezclan las bacterias auxotróficas con el compuesto químico a analizar, con o sin activación metabólica, después se diluyen las células tratadas a muy baja concentración y se distribuyen en 100 tubos conteniendo medio con cantidades limitadas de nutrientes. Este método es utilizado para screening de compuestos químicos débiles o de actividad indetectable cuando son analizados en el ensayo tradicional de incorporación en placa (155).

Hemos decidido para llevar a cabo nuestro estudio utilizar el ensayo de incorporación en placa, el cual puede experimentar modificaciones en función de las propiedades de la sustancia a analizar, con el propósito de obtener una mejora en los resultados y una vez adoptado el criterio a seguir, el protocolo debe ser estandarizado a fin de asegurar la reproducibilidad de los resultados.

2.3 CRITERIOS PARA ACEPTAR DATOS DE MUTAGENICIDAD

Aunque el diseño de un estudio concreto depende de cada investigador, para asegurar una homogeneidad en los datos han de seguirse unos criterios sobre el protocolo de Salmonella publicado por Ames et al.(13), y el de Green y Muriel (38) correspondiente al test de *Escherichia coli* WP2.

Una comparación de estas publicaciones muestra solo diferencias mínimas en los protocolos de estos dos sistemas de ensayos con respecto al método de incorporación directa en placa y el método de preincubación.

Los criterios a los que me refería anteriormente son:

- * Sólo se aceptan los métodos de incorporación directa en placa y de preincubación.
- * Los protocolos estarán en concordancia con lo descrito por Ames et al. (13) o Green y Muriel (38).
- * Todas las placas para ambos métodos deben hacerse por triplicado.
- * El número de revertantes espontáneas debe situarse en valores cercanos a lo esperado.
- * En cada ensayo se debe aplicar el solvente y los controles positivos apropiados.
- * Se puede establecer una tasa de error debida a la variabilidad intralaboratorio de un 10% (29); si se presta cuidadosa atención al protocolo, con el fin de evitar una variabilidad innecesaria, el porcentaje de error puede disminuirse a un 5% (32).
- * Aunque no siempre es necesario o relevante se recomienda un sistema de activación metabólica como el S9 mix (13).

2.4 CRITERIOS PARA DEFINIR UNA RESPUESTA POSITIVA

De nuevo, la evaluación de lo datos y de los criterios de interpretación corresponde a cada investigador. No pueden aplicarse criterios rígidos en todos los casos y la

experiencia del investigador con el método particular empleado debe servir como arbitro final en muchos casos.

Las recomendaciones publicadas en éste sentido para el sistema de *Escherichia coli* WP2 son las siguientes (39):

- * Debe existir un incremento relacionado con la dosis del número de mutantes por placa o de la frecuencia de mutación que supere al menos 3 concentraciones ampliamente separadas. El nivel de incremento sobre los controles debe ser de al menos 2 veces.
- * Se recomienda que al menos cada ensayo se repita una vez en otro estudio independiente.

3. CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO

Se han propuesto varios métodos para la interpretación de resultados obtenidos en el ensayo de incorporación en placa; todos ellos tienen como finalidad establecer un criterio para considerar al compuesto mutagénico/no mutagénico y cuantificar dicho efecto.

A la hora de cuantificar un compuesto como mutagénico o no mutagénico, los autores no se ponen de acuerdo y emplean distintos criterios. Generalmente se aplica "la regla de las dos veces" (13).

El incremento de dos veces sobre el valor de la mutación espontánea, tiene varias desventajas. En cepas con una mutación espontánea baja ($< 20\%$), los autores tienden a requerir un incremento de más número de veces que cuando el incremento espontáneo de fondo es alto.

En estos casos el "incremento de dos veces modificado", que introduce el requerimiento de una relación dosis/respuesta para considerar los resultados positivos, mejora el promedio de falsos positivos para las cepas sin plásmido aunque no lo elimina

totalmente (157).

Por otro lado, para las cepas con una mutación espontánea alta, como la WP2 uvrA pKM101, el incremento de dos veces podría ser un requerimiento muy restrictivo para determinar el efecto positivo. Por ello algunos autores no consideran válida esta regla para la cepa mencionada y en este caso aplican el criterio de 100 revertantes en exceso de los controles (158).

Un resultado positivo, para la mayoría de los compuestos evaluados, indica la existencia de un grupo de concentraciones que produce una curva dosis/respuesta con una porción lineal: ésta a medida que se incrementa la concentración del producto se achata y finalmente descende debido, principalmente, a efectos de toxicidad.

Una medida de la potencia mutagénica de un producto, si se asume una relación dosis/respuesta lineal a bajas dosis mutagénicas sería la pendiente de la recta, es decir, el incremento absoluto del número de revertantes por unidad de dosis, o su inversa, la dosis requerida para producir un incremento de una unidad en el número de revertantes. La pendiente de la curva dosis/respuesta depende de la escala de concentraciones utilizada.

Basándose en lo anterior, Berstein et al. (159), describen una aproximación para elegir las concentraciones que se encuentran en esta porción lineal de la curva dosis/respuesta así como un método para estimar la pendiente inicial de la curva y determinar la bondad del ajuste,

Green (155), describe un método estadístico consistente en un análisis de la varianza y Moore y Felton (124) posteriormente le añaden un análisis de regresión. La comparación de ambos métodos indica que están de acuerdo en la clasificación de los agentes como mutagénicos y no mutagénicos.

Otros autores para estimar la respuesta mutagénica, utilizan modelos estadísticos como es el caso de Weinstein y Lewinson (160) que aplican un análisis convencional de

la varianza.

Además de la mutagénesis y la toxicidad, son muchos los factores que pueden afectar a la pendiente de la curva dosis/respuesta, por ello a la hora de hacer un análisis estadístico de los datos, muchos autores han elegido modelos que tienen en cuenta la toxicidad del producto y otros factores que podrían afectar a la pendiente de la curva (161, 162).

Sin embargo es difícil incorporar en un modelo los múltiples factores que pueden afectar a la pendiente de la curva dosis/respuesta y en particular, el mecanismo de toxicidad que probablemente varíe para los distintos productos.

Chu et al. (157), después de realizar un análisis de los métodos utilizados para determinar si un ensayo de mutagenicidad se consideraba positivo o negativo indican que en general, los métodos estadísticos dan lugar a un elevado número de falsos positivos y que la "regla de las dos veces" puede dar lugar a falsos positivos o falsos negativos dependiendo de la tasa de mutación espontánea.

Por último McCann et al (163), realizan una evaluación de los datos del test de Ames, existentes en la literatura publicada, aplicando el método estadístico de Berstein et al., (159) y comparan los resultados obtenidos en el test estadístico con la opinión de los autores que, en la mayoría de las veces, suele ser la llamada "regla de las dos veces".

Los resultados en ambos casos fueron coincidentes en su mayor parte, sin embargo se observaron algunas diferencias. Las razones de las mismas serían por una parte la tendencia de los métodos estadísticos a considerar más experimentos positivos cuando existe una relación dosis/respuesta lineal, mientras que los autores por su parte, tienden a juzgar más experimentos positivos que los métodos estadísticos cuando la dosis/respuesta no es lineal.

Esto pone de manifiesto que la elección del método influye en la interpretación del resultado, por ello se considera conveniente el establecimiento de un mismo criterio para informar un resultado y, puesto que ninguno es considerado como el ideal, podría admitirse el uso combinado de más de un método, basado siempre en la realización de ensayos repetidos.

Por todo lo expuesto decidimos aplicar dos metodologías diferentes para nuestro ensayo, para así cuantificar el efecto mutagénico con más garantías. Estos métodos son:

1. El cálculo del índice de mutagenicidad en función de la regla de las dos veces
2. El método estadístico por medio del cálculo del análisis de la varianza.

4. MUTAGENICIDAD EN AGUAS CLORADAS

Existen datos los cuales sugieren que el uso de cloro como desinfectante puede ser al menos parcialmente responsable de la presencia de mutágenos no volátiles en agua de bebida (58, 57, 164).

De cualquier modo, los posibles sustratos implicados en la formación de compuestos mutagénicos en agua de bebida no han recibido un estudio sistemático.

Las sustancias húmicas son posiblemente candidatos como precursores a la formación de mutágenos ya que suponen la mayor parte de materia orgánica en muchos abastecimientos de agua (165, 92, 166, 83).

Por otra parte, trabajos recientes (95, 96) han demostrado que los ácidos húmicos y fúlvicos del agua reaccionan con el cloro para producir mutágenos de acción directa.

En los últimos años se ha observado actividad genotóxica de concentrados orgánicos de agua de bebida a través de sistemas *in vitro* incluyendo células microbianas, de mamífero y eucariotas así como plantas.

Aunque se han desarrollado pocos estudios para examinar el daño genotóxico *in vivo*, poca o ninguna evidencia de genotoxicidad ha sido observada utilizando ensayos con animales completos (46).

Los trabajos de Loper et al. (167), Glatz et al. (168), Nestmann et al. (169), Heartlein et al. (170) y Kool et al (171), han demostrado que los compuestos químicos mutagénicos se encuentran comúnmente en agua de bebida preparada.

4.1 FUENTES DE MUTAGENOS

Existen tres fuentes potenciales de genotoxicidad general de las cuales éstos productos químicos podrían surgir:

- productos naturales en abastecimientos de agua
- contaminación procedente de la industria y/o de la agricultura en abastecimientos de agua
- productos que surgen durante la distribución y/o tratamiento del agua (coagulantes, desinfectantes...)

Los tipos de mutágenos presentes en fuentes de agua contaminadas aparecen sustancialmente diferentes a aquellos que se forman sobre la cloración de fuentes no contaminadas. Loper (156) ha sugerido que la mutagénesis probablemente originada de las fuentes contaminadas por la industria o la agricultura es dependiente del sistema de activación microsomal, mientras que aquéllas fuentes no impactadas por éstas descargas muestran mutagenicidad directa siguiendo la cloración, la cual además disminuye por la presencia de la mezcla S9.

Una cuestión relacionada es la de si los promutágenos en fuentes de agua contaminadas, los cuales son activados por enzimas hepáticas, tienen un riesgo mayor que el de los mutágenos formados durante la cloración que actúan de manera directa, los cuales son inactivados por preparaciones de enzimas hepáticas.

La evidencia de la introducción de mutágenos durante el tránsito del agua de bebida desde la planta de tratamiento hasta el grifo, ha sido obtenida a través de dos estudios (172, 173). Al menos tres posibilidades pueden dar cuenta del incremento de la mutagenicidad después de la distribución de agua, entre las que se incluyen:

1. Arrastre del interior de las superficies de los tanques y conductos los cuales están cubiertos con pinturas asfálticas o carbón de alquitrán.
2. Formación de productos generados por la desinfección debido a la reacción del cloro residual con compuestos orgánicos.
3. Crecimiento microbiano y conversión de compuestos químicos inactivos en mutagéneos (172).

4.2 IDENTIFICACION DE COMPUESTOS GENOTOXICOS

Debido al conocimiento acerca de determinados compuestos mutágenos como posibles carcinógenos y como agentes que pueden inducir mutaciones hereditarias, un importante objetivo en materia de salud pública es determinar si la exposición crónica a productos químicos mutágenos en agua de bebida posee un riesgo significativo para la salud.

Como primer paso para responder a la premisa anterior, un número de investigadores han intentado identificar los compuestos químicos responsables de la actividad mutagénica observada en concentrados de aguas de bebida.

Desafortunadamente, la tarea de atribuir niveles de mutagenicidad a contaminantes químicos específicos ha resultado ser dificultosa por un número de razones, entre las que se incluyen:

1. El número de compuestos químicos individualmente considerados en agua de bebida es bastante amplio. Más de 1100 compuestos fueron identificados en cinco ciudades diferentes de USA; aproximadamente fueron detectados cerca de dos veces

más, pero no pudieron identificarse. Muchos de los constituyentes identificados están presentes en niveles inferiores a 1 µg/l.

2. En dos estudios separados se ha examinado la genotoxicidad de determinados compuestos identificados, aproximadamente un tercio de los que fueron analizados para comprobar su actividad (174) o de los cuales se disponía de información genotóxica (175), resultaron ser positivos en uno o más sistemas.
3. Aproximadamente, el 90% del contenido orgánico disuelto en agua de bebida está integrado por compuestos no volátiles que son difíciles de extraer del agua y los cuales no son fácilmente separables a través de cromatografía de gases, debido a que se trata de sustancias polares y/o con pesos moleculares altos.
4. El residuo orgánico obtenido de la concentración de las muestras de agua, el cual está asociado con compuestos orgánicos no volátiles, es frecuentemente mutagénico (45).
5. Debido a la ausencia de datos cuantitativos, la contribución al conjunto de la actividad mutagénica de muchos de los mutágenos identificados es hoy día desconocido (46).

A causa de la amplia variedad de potencia mutagénica de los productos químicos, la actividad mutagénica en agua de bebida puede atribuirse bien a un efecto acumulativo de un gran número de compuestos o principalmente a unos pocos compuestos muy potentes (163).

En apoyo de la última posibilidad hay que destacar la identificación en años recientes del 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)furanona (MX), como un importante componente mutagénico de agua de bebida clorada (100).

A pesar de las dificultades analíticas, el MX ha sido identificado en un total de 37 muestras de agua de bebida en Estados Unidos, Gran Bretaña y Finlandia (176, 177, 100, 97). Se estima que la contribución del MX se encuentra entre el 5 y el 60% de la mutagenicidad, con un valor medio cercano al 30% en el estudio llevado a cabo por Kronberg y Vartianen (176).

Estos hallazgos han conducido a la identificación del isómero del MX, el E-MX y de numerosos compuestos los cuales en conjunto contribuyen con menos del 10% a la actividad mutagénica.

La cuestión es si el MX o cualquier otro derivado clorado posee un riesgo real para la salud del hombre.

Dado que tanto el MX como su isómero son muy difíciles de aislar, hemos decidido en nuestro estudio concentrar globalmente todos los compuestos no volátiles presentes en la muestra de agua a estudiar (178, 179). Una posibilidad en este sentido sería continuar el estudio para intentar identificar el mayor número de mutágenos que todavía quedan por ser reconocidos.

4.3 ESTUDIOS "IN VITRO" E "IN VIVO"

Las discrepancias entre los resultados de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* no están fuera de lo común y pueden tener diversas explicaciones (151).

En general, el patrón que surge de distintos estudios con concentrados de agua de bebida, materiales húmicos clorados y varias clases de productos para la desinfección es que dichas sustancias son genotoxinas que actúan de manera directa *in vitro* pero no son genotóxicas para la médula ósea de ratón siguiendo administración oral.

De todos los factores, la detoxificación metabólica parece ser una posibilidad probable para explicar la ausencia de respuesta genotóxica debida a productos mutagénicos por la cloración en la médula ósea del ratón (46).

Numerosos estudios han demostrado que los mutágenos de acción directa en agua de bebida son sustancialmente inactivados por la preparación hepática S9. De ésta forma, el metabolismo por el hígado puede prevenir que la forma activa del compuesto sea distribuida sistémicamente y tenga acceso a varios tejidos corporales.

Estudios *in vitro* han demostrado que el MX puede ser inactivado como mutágeno por conjugación con el glutatión (180).

La presencia de factores farmacocinéticos además del propio metabolismo, como la ingesta y el transporte, el nivel de compuesto en la sangre y/o el tiempo de exposición podrían ser los responsables de la ausencia de efectos.

Nosotros confirmamos los resultados obtenidos por otros autores que también han realizado estudios *in vitro* en relación con la evaluación de actividad mutagénica de derivados clorados en aguas de consumo, ya que hemos apreciado una disminución de la mutagenicidad debida a estos productos al añadir a las muestras de estudio la fracción microsomal.

4.4 CONSISTENCIA DE LOS RESULTADOS

La evidencia de cáncer en humanos por exposición prolongada a agua de bebida desinfectada con cloro ha sido evaluada en numerosos estudios epidemiológicos (109).

El estudio de comparación de casos más recientemente llevado a cabo ha obtenido resultados acerca de la evidente asociación entre agua de bebida clorada y cáncer de colon y vejiga (113, 42).

Por contra, en el estudio de Lawrence et al. (181), no se encontró asociación entre THMs en agua superficial y mortalidad por cáncer colorectal.

De cualquier manera, y como apunta Craun, cualquier interpretación de una asociación causal entre la cloración del agua y el cáncer de colon y vejiga debería esperar a la finalización de varios estudios de comparación de casos y estudios epidemiológicos

de cohortes que actualmente están en curso.

Parece ser que el pH es un factor crítico a la hora de la formación de mutágenos.

Dicha dependencia adquiere consistencia con las afirmaciones de Oliver (166) quién encontró que la formación de carbón orgánico clorado no volátil como consecuencia de la cloración de ácidos húmicos descendía conforme aumentaba el pH.

Los hallazgos anteriores concuerdan directamente con el modelo de formación de productos orgánicos halogenados volátiles, incluyendo los THMs, los cuales se presentan mayormente a pH bajo (166).

Una explicación alternativa al descenso en la cantidad de mutágenos a pH neutro y básico es que la tasa de formación de mutágenos es más baja, o bien que los mutágenos son menos estables a pH alto.

Según Kronberg et al. (178), la mayor estabilidad de los mutágenos estaría alrededor de pH 2.

Nosotros hemos realizado el estudio a pH neutro, imitando las condiciones que se producen en el abastecimiento de un agua de consumo público a un municipio.

Una alternativa viable sería la realización del estudio acidificando las muestras, para así favorecer la estabilidad de los compuestos más tiempo con lo que posiblemente podrían ser aislados e identificados.

Por otra parte este tipo de estudios están influidos por numerosos factores externos como pueden ser la fuente de agua de empleada, la concentración de los productos derivados de la cloración en el agua, la cantidad de agua consumida, si se trata de fuentes de abastecimiento de agua superficiales o profundas, ya que estas tienen menos cantidad de materia orgánica y son mucho menos cloradas, así como el área geográfica estudiada (182).

En apoyo de la sugerencia anterior destaca el hallazgo de cantidades significativamente mayores de cloroformo, bromodiclorometano y carbón orgánico total en aguas superficiales que en aguas profundas. El bromoformo se encontró en mayor cantidad en aguas profundas que en las superficiales.

Se está realizando un estudio en Wisconsin con el fin de evaluar el riesgo de padecer cáncer de colon en las poblaciones expuestas al consumo de diferentes niveles de sustancias contaminantes volátiles de carácter orgánico en aguas profundas. Los resultados preliminares han sugerido la existencia de asociación entre la incidencia de cáncer de colon y la exposición a 1,1,1-tricloroetano, tetracloroetileno y tricloroetileno en aguas profundas (183).

Actualmente no existe evidencia directa para implicar los compuestos químicos genotóxicos producidos durante la cloración del agua en el aparente incremento de la incidencia de cáncer en humanos.

De cualquier modo, los resultados positivos procedentes de estudios *in vitro*, la limitada evidencia de estudios de carcinogenicidad en animales de experimentación, la demostración de actividad genotóxica de un número de productos para la cloración que han sido identificados y los resultados de varios estudios epidemiológicos en humanos, son diferentes factores que tomados en conjunto sugieren que la exposición a productos de cloración podría estar siendo subestimada.

En nuestro caso nos hemos limitado a realizar el estudio *in vitro*, por lo que no podemos aportar ninguna información novedosa en cuanto a la extrapolación de los resultados obtenidos al hombre.

La aplicación del test de *Escherichia coli*, utilizando el método de incorporación en placa nos ha permitido valorar los compuestos orgánicos formados durante la cloración de un agua de consumo público desde el punto de vista de su posible mutagenicidad.

Las cepas de estudio que proporcionaron los mayores índices de mutagenicidad fueron WP2 *uvrA*⁻ y WP2 *uvrA*⁻ pKM101.

Especialmente se obtuvieron los mayores valores de mutagenicidad con la cepa WP2 *uvrA*⁻ pKM101, éste hecho coincide con la opinión de los autores, al considerar esta cepa extremadamente sensible a un amplio rango de compuestos químicos (134).

Asimismo se recomienda utilizar la cepa WP2 *uvrA*⁻ pKM 101 en combinación con la cepa TA100 de *Salmonella tiphymurium* (134), como así se hizo al realizar un ensayo paralelo sobre mutagenicidad de concentrados orgánicos en aguas de bebida en diversas cepas de *Salmonella tiphymurium*.

La cepa WP2 *uvrA* pKM101 detecta como mutágenos todos aquellos carcinógenos que dieron resultado positivo ante la cepa TA100 (134).

Las cepas empleadas derivan todas de la cepa WP2, y detectan agentes que producen mutaciones de pares de bases, por lo que podemos deducir que las posibles mutaciones originadas por los compuestos ensayados se llevarían a cabo por este mecanismo.

Un mayor incremento en la tasa de mutación en *Escherichia coli* WP2 *uvrA*⁻ que en *Escherichia coli* WP2, indica que un compuesto causa daño del ADN a través de una sustitución de un par de bases que podría ser reparado normalmente por un sistema reparador de la escisión del ADN.

En ninguno de los ensayos se obtuvo una evaluación mutagénica positiva, alcanzándose con la cepa WP2 *uvrA*⁻ pKM101 el mayor valor de índice de mutagenicidad en el ensayo 3 sin activación metabólica, siendo de 1.82.

También se alcanzaron valores altos con las otras dos cepas, concretamente con la WP2 en el ensayo 4 sin activación metabólica se obtuvo un índice de mutagenicidad de 1.75 y con la WP2 *uvrA*⁻ en el ensayo 1 sin activación metabólica se llegó a un índice de mutagenicidad de 1.76.

El comportamiento de las bacterias fue similar en el ensayo con fracción microsomal S9, obteniéndose los índices más bajos con las cepas WP2 y WP2 *uvrA*⁻.

Por ello a la hora de considerar a los compuestos como no mutagénicos, solamente hemos tenido en cuenta el índice de mutación (I.M.).

Otras causas que podrían explicar los resultados obtenidos serían la concentración de los sustratos, el pH de la muestra, la temperatura, el tiempo de reacción, el método de extracción/concentración previo al análisis de los productos, son todas variables que deben ser consideradas en el diseño del experimento.

En estos ensayos no hemos calculado la curva dosis respuesta porque aunque los resultados obtenidos del test estadístico empleado (ANOVA) han sido significativos, hay gran variabilidad entre unos ensayos y otros, no existiendo evidencia biológica significativa, así como también entre cepas y aún dentro de la misma cepa (124).

En España no hemos encontrado ningún estudio realizado con características similares, por lo cual no hemos podido comparar nuestros resultados con los de otros autores.

Sería aconsejable profundizar en el estudio empleando otros métodos de ensayo como el de la preincubación en placa, intentando obtener las curvas dosis respuesta y la potencia mutagénica.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Con respecto a la evaluación mutagénica de los concentrados orgánicos derivados del agua de consumo público analizado, no hemos encontrado actividad mutagénica positiva en ninguna de las muestras ensayadas con el test de *Escherichia coli*.
2. La cepa WP2 uvrA⁻ pKM 101 ha resultado ser la más adecuada para detectar la mutagenicidad derivada de los concentrados orgánicos en agua de consumo público, al ser la más sensible.
3. Igualmente con la cepa anteriormente mencionada se han obtenido valores de índices de mutagenicidad superiores a 1.5 alcanzándose por tanto la calificación de "ligera mutagenicidad".
4. La actividad mutagénica de estos compuestos posiblemente se basa en una sustitución de pares de bases, que es lo que detecta el test empleado.
5. La presencia de la fracción microsomal (S9+) disminuye la mutagenicidad inducida en todas las cepas.

Por todo ello, se pone de manifiesto la necesidad de continuar las investigaciones en este sentido, con el fin de valorar de forma rigurosa los efectos que sobre la salud humana pueda tener la exposición prolongada a los derivados clorados contenidos en el agua de consumo público.

En el caso de comprobarse la premisa anterior se podría plantear el uso de desinfectantes alternativos.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. **Purchase IFH.** An appraisal of predictive tests for carcinogens. *Mutat Res* 1982; 99: 53-71.
2. **Bernard A, Lawerys R.** Les risques mutagenèse et carcinogenèse des toxiques industriels. *Archives des Maladies Professionnelles de Médecine du Travail et de Sécurité Sociale*, 1989; 50: 779-784.
3. **Doll R., Peto R.** The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in United States today. *J Nat Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
4. **OPS/OMS** Criterios de Salud Ambiental. 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. *Pub Cien OPS/OMS* 1980; 402: 287.
5. **Yamagiwa K, Ichikawa K.** Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J Cancer Res* 1918; 3:1-29.
6. **Boyland E.** Chemical carcinogenesis and experimental chemotherapy of cancer. *Yale J Biol Med*, 1947; 20: 321-341.
7. **Miller JA, Miller EC.** The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr. Exp. Tumor Res* 1969; 11: 273-301.
8. **Auerbach C, Robson JM.** Chemical production of mutation. *Nature*, 1946; 157: 302.
9. **Malling HV.** Dimethylnitrosamine; Formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. *Mutat Res*, 1971; 13: 425-429.
10. **Garner RC, Miller EC, Miller JA, Garner JV, Hansen RS.** Formation of a factor lethal for *S. typhimurium* TA 1530 y TA 1531 on incubation of Aflatoxin B1 with rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971; 45: 744-780.
11. **Ames BN, Lee FD, Durston WE.** An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci*, 1973; 70: 782-786.

12. **Ames BN, Durston WE, Lee FD.** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci* 1973; 70: 2281-2285.
13. **Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E.** Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci*, 1975; 72: 2423-2427.
14. **Miller JH.** Mutational specificity in bacteria. *Ann Rev Genet*, 1983; 77:215-238.
15. **Sterisinger et al.** Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1966; 31:77-84.
16. **Hofnung M, Quillardet P.** Recent developments in bacterial short-term test for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis* 1986; 1: 319-330.
17. **Weinstein B.** The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1988; 48: 4135-4143.
18. **Boutwell RK.** Function and Mechanism of Promoters of Carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 1974; 2: 419-443.
19. **World Health Organization.** *Guide to Short-term Test for detecting mutagenic and Carcinogenic chemicals.* En: Environmental Health Criteria 51. Geneva, WHO, 1985: 162-170.
20. **Taylor SL.** Mutagenesis versus Carcinogenesis. *Food Technology* 1982; : 65-127.
21. **Leonardo A.** Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of *in vitro* approaches. *Mut Res* 1988; 321-326.

22. **Yamasaki M, Enamoto K, Fitzgerald DJ, Mesnil M, Katoh F, Hollstein M.** Role of intercellular communication in the control of critical gene expression during multistage carcinogenesis. En: Kakunaga T, Sugimura T, Tomatis L, Yamasaki H. (Eds.) *Cell differentiation genes and cancer*. I.A.R.C., 1988; 92: 57-75.
23. **Lave LB; Ennever FK, Rosenkranz HS, Omenn GS.** Information value of rodent bioassay. *Nature*, 1988; 336:631-633.
24. **World Health Organization.** Environmental Health Criteria 47. *Summary report on the Evaluation of Short-term Test for Carcinogens (Collaborative Study on in vitro test)*, Geneva, 1985; 42-65.
25. **Moreau P, Devoret R.** Potential carcinogens Tested by induction and mutagenesis of Prophage lambda in Escherichia Coli K12. En: *Origins of Human Cancer*, Book C. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1977; 1451-1472.
26. **Smith M.** In vitro mutagenesis. *Ann Rev Genet*, 1985; 19: 423-462.
27. **McCann J, Choi E, Yamasaki E. and Ames BN.** Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci*, 1975a; 72/12:5135-5139.
28. **McCann J, Spigarn NE, Kobori J and Ames BN.** Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Natl Acad Sci* 1975b; 72/3: 979-983.
29. **Purchase IFH, Longstaff E, Ashby J, Styles JA, Anderson D, Lefevre PA, Wetswood FR.** Evaluation of six short term for detecting organic chemicals carcinogens and recommendation for their use. *Nature*, 1976; 264: 624-627.

30. **Rinkus SJ, Legator MS.** Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Can Res* 1979; 39: 3289-3318.
31. **Laborda E, De la Peña E.** Carcinogénesis química. En: SIRMCE Congreso de Madrid 1981. *Medio Ambiente, Trabajo y Salud*. Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, 1982; 245-259.
32. **De Serres FJ, Ashby J (Eds).** *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Report of the International Collaborative Programme, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1981.
33. **Anderson WB, Huck PM, Daignault SA, Irvine GA, Rector DW, Savage E, von Borstel RC, Williams DT.** Comparison of Drinking Water Disinfectants Using Mutagenicity Testing. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*; Lewis Publisher, 1987; 6: 201-225.
34. **Bridges BA, Dennis RE, Munson RJ.** Differential induction and repair of ultraviolet damage leading to true reversions and external suppressor mutations on an ochre codon in *Escherichia coli* B/ WP2. *Genetics* 1967; 57:897.
35. **Osborn M, Person S, Phillips S y Funk F.** A determination of mutagen specificity in bacteria using nonsense of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 1967; 26: 437-447.
36. **Witkin EM.** Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. *Ann Rev Genet* 1969; 3:525.
37. **Clarke CH, Wade MJ.** Evidence that caffeine, 8-methoxypsoralen and steroidal diamines are frameshift mutagens for *E. coli* K-12. *Mutat Res* 1975; 123-125.
38. **Green MHL, Muriel WJ.** Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1976; 38: 3-32.

39. **Brusick DJ, Simmon VF, Rosenkranz HS, Ray VA, Stafford RS.** An Evaluation of the *Escherichia coli* WP2 and WP2 uvrA⁻ Reverse Mutation Assay. *Mutat Res* 1980; 76: 169-190.
40. **Rossman TG, Klein CB.** From DNA damage to mutation in mammalian cells: a review. *Environ Mol Mutagen* 1988; 11: 119-125.
41. **Little CA, Tweats DJ, Pinney RJ.** Relevance of plasmid PKM 101-mediated mutagenicity in bacteria to genotoxicity in mammalian cells. *Mutagenesis* 1989; 4:371-375.
42. **Cantor KP, Hoover R, Hartge P, Mason TJ, Silverman DT and Levin LI.** Drinking Water Source and Risk of Bladder Cancer: A Case Control Study. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5. Lewis Publisher; 1984, 145-152.
43. **Clark SW.** Key issues for regulation Disinfectin By-products. En: *Regulation Drinking water Quality*. Lewis Publishers, 1992; 135-144.
44. **Loper JC.** Overview of the use of short-term Biological test in the Assessment of the Health Effects of Water Chlorination. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*. Ann. Arbor Science, 1980; 3:937-945.
45. **Meier JR.** Genotoxic activity of organic chemicals in Drinking Water. *Mutat Res* 1988; 196: 211-245.
46. **Middleton FM, Petit HH, Rosen AA.** The mega samplex for extensive investigations of organics pollutants in water. En: *Proc 17th Industrial Waste Conference*, Purdue University, Ext Ser, 1962; 122: 454-460.
47. **Hueper WC, Payne WW.** Carcinogenic effects of adsorbates of raw and finished water supplies. *Am J Clin Pathol* 1963; 39:475-481.

48. **U.S. Environmental Protection Agency** (1974) Draft Analitical Report, New Orleans Area Water Supply Study, Region VI, Surveillance and Analysis Division, *Report EPA 906/10-74-002*.
49. **Junk GA, Stanley SE.** Organics in drinking water. Part 1. *Listing of identified compounds*, Springfield, VA, National Technical Information Service, 1975.
50. **McCabe, LJ.** Health effects of organics in drinking water. En: *Proc Water Quality Technol Conf Ann*, 1977; 4-6.
51. **DeRouen TA, Diem JE.** The New Orleans drinking water controversy: A statistical perspective. *Am J Public Health* 1975; 65:1060-1062.
52. **Page NP, Saffcotti U.** *Report on Carcinogenesis Bioassay of Chloroform*, National Cancer Institute, Bethesda, MD, 1976.
53. **Cantor KP, McCabe LJ.** The Epidemiologic Approach to the Evaluation of Organic in Drinking Water. En: Jolley RL, Gorchev H, Hamilton DH, Jr. (Eds). *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science Publishers, INC 1978; 2: 379-393
54. **Wilkins III JR, Reiches NA, Kruse CW.** Organic chemical contaminants in drinking water and cancer. *Am J Epidemiol* 1979; 110:420-448.
55. **Rook JJ.** Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat Exam* 1974; 23: 234-243.
56. **Maruoka S, Yamanaka SI.** Production of mutagenic substances by chlorination of waters. *Mutat Res* 1980; 79: 381-386.
57. **Cheb AM, Skochdopole J, Koski P, Cole L.** Nonvolatile mutagens in drinking water: production by chlorination and destruction by sulfite. *Science*, 1980; 207: 90-92.

58. **Kopfler FC.** Alternative strategies and methods for concentrating chemicals from water. En: Waters MD et al (Eds). *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures II*, Plenum Press, New York, 1980; 141-153.
59. **Jolley RL.** Concentrating organics in water for biological testing. *Environ Sci Technol* 1981; 15: 874-880.
60. **Wilcox P, Williamson.** Mutagenic activity of concentrated drinking water samples. *Environ Health Perspect* 1986; 69:141-149.
61. **Monarca S, Hongslo JK, Kringstad A and Carlberg GE.** Microscale fluctuation assay coupled with Sep-pak concentration as a rapid and sensitive method for screening mutagens in drinking water. *Water Res* 1985; 19: 1209-1216.
62. **Ringhand HP, Meier JR, Kopfler FC, Schenck KM, Kaylor WH, Mitchell DE.** Importance on sample pH on the recovery of mutagenicity from drinking water by XAD resins. *Environ Sci Technol*, 1987; 382-387.
63. **Monarca S, Pasquini R, Sforzolini GS.** Mutagenicity Assessment of Different Drinking Water supplies before and after treatments. *Bull Environm Contam Toxicol* 1985; 4:815-823.
64. **Kool HJ, van Kreijl CF, de Greef E, van Kranen HJ.** Presence, introduction and removal of mutagenic activity during the preparation of drinking water in The Netherlands. *Environ Health Perspect*, 1982; 46: 207-214.
65. **Kronberg L, Holmbom B, Tikkanen L.** Mutagenic activity in drinking water and humic water after chlorine treatment. *Vatten*, 1985; 41: 106-109.
66. **Meier JR, Ringhand HP, Coleman WE, Schenck KM, Kaylor WH, Kopfler FC.** Mutagenic by-products from chlorination of humic acid. *Environ Health Perspect*, 1986; 69: 101-107.

67. **Alink GM.** Genotoxins in waters. En: Sorsa M, Vainio H. (Eds). *Mutagens in our Environment*, Liss, New York, 1982; 261-276.
68. **van der Gaag MA, Noordsij A, Orange JP.** Presence of mutagens in Dutch surface water and effects of water treatment processes for drinking water preparation. En: *Mutagens in Our Environment*, Liss, New York, 1982; 277-286.
69. **Maruoka S, Yamanaka SI.** Mutagenic potential of laboratory chlorinated river water. *Sci Total Environ* 1983; 29: 143-154.
70. **Kool HJ, van Kreijl CF, van Kranen HJ.** Use of XAD- resins for the Detection of Mutagenic Activity in Water. Studies with drinking water. *Chemosphere* 1981; 10 (1): 99-108.
71. **Bull RJ, Meier JR, Robinson M, Ringhand HP, Laurie RD y Stober JA.** Evaluation of mutagenic and carcinogenic properties of brominated and chlorinated acetonitriles: By-products of chlorination. *Fund Appl Toxicol*, 1985; 5: 1065-1074.
72. **Loper JC.** Water contamination and environmental mutagens. En: Muhammed A, von Borstel RC (Eds). *Basic and Applied Mutagenesis*, Plenum, New York, 1985; 43-61.
73. **National Cancer Institute.** *Report on the Carcinogenesis Bioassay of Chloroformo*, Washington, DC, 1976.
74. **Symons et al.** National organics reconnaissance survey for halogenated organics. *J Am Wat Works Ass*, 1977; 67: 634-647.
75. **Bellar TA, Lichtenberg JJ.** Determining volatile organics at microgram-per-liter level by gas cromathography. *J Am Water Works Assn* 1974; 66:739-744.

76. **Symons J, Bellar TA, Carsweel JK, DeMarco J, Kropp KL, Robeck GG, Seeger DR, Slocum CJ, Smith BL, Stevens AA.** National organics reconnaissance survey for halogenated organics. *J An Wt Wks Assn* 1975; 67(11): 634-647.
77. U.S.Environmental Protection Agency (1978) National Organics Monitoring Survey, Technical Support Division, Office of Drinking Water, Cincinnati, Ohio.
78. **Palmstrom NS, Carlson RE, Cooke GD.** Potential Links between the Eutrophication of surface water and the formation of carcinogens in drinking water. En: *Regulation Drinking water Quality*. Lewis Publishers, 1992; 18: 175-190.
79. **Cotruvo JA.** Drinking Water Perspective. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and health Effects*. Ann. Arbor Science, 1981; 4 (Pte 2): 1417-1422.
80. **Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público.** Real Decreto 1138/1990 14/9/1990. B.O.E. núm 226 de 20/9/1990.
81. **Symons JM et al.** Treatment for Controlling Trihalomethanes in Drinking Water, Environmental Protection Agency, EPA-600/2-81-156, Cincinnati (1981).
82. **Olivieri VP.** Human pathogens, Disinfection and Chlorine. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher 1984; 5: 5-8.
83. **Christman RF, Johnson JD, Pfaender FK, Norwood DL, Webb MR.** Chemical identification of aquatic humic chlorination products. En: Jolley RL, Brungs WA, Cumming RB (Eds). *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science, Michigan 1980; 3: 75-84.

84. **Coleman WE, Munch JW, Kaylor WH, Streicher RP, Ringhand HP, Meier JR.** GC/MS analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid - a comparison of the by-products to drinking water contaminants. *Environ Sci Technol*, 1984; 18: 674-681.
85. **Rook JJ.** Chlorination reactions of fulvic acids in natural waters. *Environ Sci Technol* 1977; 11: 478.
86. **Glaze WH, Peyton GR, Saleh FY, Huang FY.** Analysis of disinfection by-products in water and wastewater. *Int J Environ Anal Chem* 1979; 7: 143-160.
87. **Steinberg C, Muenster U.** Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater. En: Aiken GR et al. (Eds). *Humic substances in Soil, Sediment and Water*, Wiley, Toronto, 1985; 105-145.
88. **Malcolm RL.** Geochemistry of stream fulvic and humic substances. En: Aiken GR et al. (Eds). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, Wiley, Toronto, 1985; 181-209.
89. **Thurman EM.** Humic substances in groundwater. En: Aiken GR et al. (Eds). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, Wiley, Toronto, 1985; 87-103.
90. **Thurman EM, Malcolm RL.** Preparative isolation of Aquatic Humic Substances. *Environ Sci Technol*, 1981; 15:463-466.
91. **Kim H-S, Symons JM.** The removal of various aquatic humic substances molecular weight fractions by anion exchange resin. *J Am W Works Assoc*, 1989; 1627-1642.
92. **Rook JJ.** Haloforms in drinking water. *J Am Wt Wks Assn*, 1976; 68: 168-172.

93. **Roberts MH, Jr.** Water Chlorination: Is There Environmental Risk?. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher, 1987; 6: 969-970.
94. **Coleman WE, Munch JW, Kaylor WH, Ringhand HP, Meier JR.** GC/MS analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acids-a comparison of the by-products to drinking water contaminants. *Environ Sci Technol* 1984; 18:674-681.
95. **Bull RJ, Robinson M, Meier JR, Stober J.** The use of biological assay systems to assess the relative carcinogenic hazards of disinfection byproducts. *Environ Health Perspect* 1982; 46: 215-227.
96. **Meier JR, Lingg RD, Bull RJ.** Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A model for mutagen formation during drinking water treatment. *Mutat Res* 1983; 118: 25-41.
97. **Hemming J, Holmbom B, Reunanen M, Kronberg L.** Determination of the strong mutagen, 3-chloro-4- (di-chloro-methyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking water and humic waters. *Chemosphere* 1985; 15: 549-556.
98. **Holmbom B, Kronberg L, Backlund P, Langvik V-A, Hemming J, Reunanen M, Smeds A, Tikkanen L.** Formation and Properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, A potent Mutagen in Chlorinated Waters. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher, 1987; 6: 125-135.

99. **Kronberg L, Holmbom B, Tikkanen L.** Identification of the Strong Mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its Geometric Isomer E-2-Chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxobutenoic Acid in Mutagenic Fractions of Chlorine-Treated Humic Water and in Drinking Waters. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher INC, 1987; 6: 137-146.
100. **Meier JR, Knoch RB, Coleman WE, Ringhand HP, Munch JW, Kaylor WH, Streicher RP, Kopfler FC.** Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acids solutions. *Mutat Res* 1987a; 189: 363-373.
101. **Coleman WE, Munch JW, Hodakievic PA, Kopfler FC, Meier JR, Streicher RP Y Zimmer H.** GC/MS analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid and drinking waters following HPLC fractionation of strong acid extracts. Paper presented at the 194th *Meeting of the American Chemical Society*, Aug30- Sep 4, 1987, New Orleans, LA.
102. **Meier JR.** Mutagens in chlorinated water. *Mutation and the Environment*, Part E; 1990; 11-19.
103. **Pereira MA.** Carcinogenicity of Chlorination By-products: Trihalomethanes. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science, 1981; 4(2): 1165-1176.
104. **Jorgenson T, Rushbrook C.** *Effects of Chloroform in the Drinking Water of Rats and Mice: Ninety-day Subacute Toxicity Study*, EPA-600/1-80-030 (1980).
105. **Heywood R et al.** Safety Evaluation of Toothpaste Containing Chloroform. III. Long-Term Study in Beagle Dogs. *J Environ Pathol Toxicol*, 1979; 2: 835-851.

106. **Munson A, et al.** Toxicology of Organic Drinking Water Contaminants: Trichloromethane, Bromodichloromethane, Dibromochloromethane and Tribromomethane. *Environ Health Perspec* 1981; 46: 117-26.
107. **Kool HJ, van Krejil CF, Zoeteman BCJ.** Toxicology assesment of organic compounds in drinking water. En: Straub CP (Eds). *Critical Reviews in Environmental Control*, vol 12, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983; 307-358.
108. **Nestmann ER.** Mutagenic activity of drinking water. En: Stich FH (Eds). *Carcinogens and Mutagens in the Environment*, Vol 3, CRC, Boca Raton, FL, 1983; 137-147.
109. **Craun GF.** Surface water supplies and health. *J Am Wt Wks Assn*, 1988; 40-52.
110. **Page T, Harris RH, Epstein SS.** Drinking water and cancer mortality in Louisiana. *Science* 1976; 193:95-97.
111. **Burke TA, Amsel J, Cantor KP.** Trihalomethane Variation in Public Drinking Water Supplies. En: *Water Chlorination: environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1343-1351.
112. **Young TB, Kanarek MS.** Matched Pair Case Control Study of Drinking Water Chlorination and Cancer Mortality. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science, 1981; 4(2): 1365-1380. biological testing. *Environ. Sci. Technol.* 1981; 15: 874-880.
113. **Cragle DL, Shy CM, Struba RJ, Siff JE.** A Case-Control study of Colon cancer and Water Chlorination in North Carolina. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher, 1984; 5: 153-159.
114. **Shy CM.** Chemical Contamination of Water Supplies, *Environ Health Perspect*, 1985; 62: 399-406.

115. **Crump KS.** Chlorinated Drinking Water and Cancer: The Strenght of the Epidemiologic Evidence. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science, 1981; 4 (Pte 2): 1481-1491.
116. **Chriswell CD, Glatz BA, Fritz JS, Svec HJ.** Mutagenic analysis of drinking water. En: *Application of short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures*. Environmental Science Research. volume 15 Plenum Press: New York 1978; 478-494.
117. **OECD.** Lignes directrices sur l' utilisation des test de mutagenicitie pour l' evaluation toxicologique des produits chimiques. Ottawa. Canadá. 1986
118. **American Public Health Association.** *Standard Method for examination of Water and Wastewater*, Washington DC, 1971, 117-233.
119. **American Public Health Association.** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, New York, 1975.
120. **Doménech JM.** Análisis de la varianza. En: *Métodos estadísticos en ciencias de la salud*. Signo. Barcelona. 1990; 11.
121. **Wolkoff AW, Creed C.** Use of Sep-Pack[®] C₁₈ cartridges for the collection and concentration of environmental samples. *J Liq Chromat*, 1981; 4: 1459-1472.
122. **Mattern IE.** Basis of evaluation of an Ames test. *Prog Mutat Res*, 1981; 2: 273-285.
123. **Ames BN, McCann J, Yamasaki E.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975b; 31: 347-364.
124. **Moore D, Felton JS.** A microcomputer program for analysis of Ames test data. *Mutat Res*, 1983; 119: 95-102.

125. **Kier LD, Yamasaki E, Ames BN.** Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proc Natl Acad Sci*, 1974; 71: 4159-4163.
126. **Fukuoka M et al.** Characterization of mutagenicity principles and carcinogenicity test of dill weed and seeds. *J Pharm Dyn*, 1980; 3: 236-242.
127. **Nagao M, Sugimura T and Matsushima T.** Environmental mutagens and carcinogens. *Annu Rev Genet* 1978; 12: 117-159.
128. **Yamasaki E, Ames BN.** Concentration of mutagens from urine by adsorption with the non-polar resin XAD-2; Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc Natl Acad Sci*, 1977; 74: 3555-3559.
129. **Rannung U, Sundvall A, Ramel C.** The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella Typhimurium*, I. Activation through conjugation with glutathione in vitro. *Chem Biol Interact*, 1978; 20: 1-16.
130. **Ashby JA, Styles JA.** Carcinogenic synergism and its reflection in-vitro. *Br Med Bull*, 1980; 36: 63-70.
131. **Purchase IFH, Clayson DB, Preussmann R, Tomatis L.** EPA's Ordering of the NIOSH Suspected Carcinogenicity List and Activity of 42 Compounds. *Natl Tech Information Service*, 1981, Washington, DC.
132. **Ashby JA, Purchase IFH.** The selection of appropriate chemical class controls for use with short-term test for potential carcinogenicity. *Ann Occup Hyg*, 1977; 20:297-301.
133. **Hollstein M, McCann J, Angelosanto FA, Nichols W.** Short-term test for carcinogens and mutagens. *Mutat Res*, 1979; 65: 133-226.

134. **Dyrby T, Ingvarlsen P.** Sensitivity of different *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in mutagenicity testing calculated on the basis of selected literature. *Mutat Res* 1983; 123: 47-60.
135. **Sugimura T, Sato S, Nagao M, Yahagi T, Matsushima T, Seino Y, Takeuchi M, Kawachi T.** Overlapping of carcinogens and mutagens. En: P.N. Magee et al (eds). *Fundamentals in Cancer Prevention*, University of Tokyo Press; Tokyo 1976: 191-215.
136. **McMahon RE, Cline JC, Thompson CL.** Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Res*, 1979; 39: 682-693.
137. **Vennit S and Levy LS.** Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature* 1974; 250: 493-495.
138. **McCann J, Ames BN.** Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1976; 73: 950-954.
139. **Meselson M, Russell K.** Comparisons of Carcinogenic and Mutagenic Potency. En: *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, Book C, 1977; 1473-1481.
140. **McCann J, Ames BN.** The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. En: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA. (Eds). *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1977; 1431-1450.

141. **Heddle JA, Bruce WR.** Comparison of tests for mutagenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei and mutations in *Salmonella*. En: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA (Eds). *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1977; 1549-1557.
142. **Bartsch H, Malaveille C, Camus AM, Martel- Planche G, Brun G, Montesano R.** Validation and comparative studies on 180 chemicals with *Salmonella typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutat Res* 1980; 76: 1-50.
143. **Rinkus SJ, Legator MS.** Chemical characterization of 465 know or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res*, 1979; 39:3289-3318.
144. **Sugimura et al.** Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. En: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA (Eds). *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1977; 1561-1577.
145. **Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sewamura M.** Factors modulating mutagenicity in microbial test. En: Norpoth KH, Garner RC (Eds). *Short-term test systems for detecting carcinogens*. Springer. Berlín. 1980; 273-285.
146. **Bigger CAH, Tomaszewski JE, Dipple A, Lake RS.** Limitations of metabolic activation system used with *in vitro* tests for carcinogens. *Science*, 1980; 209: 503-505.

-
147. **Langenbach R, Gingell R, Kuszynski C, Walker B, Nagel D, Pour P.** Mutagenic activities of oxidized derivatives of N-nitrosodipropylamine in the liver cell-mediated and *Salmonella typhimurium* assays. *Cancer Res*, 1980; 40: 3463-3469.
148. **Jones CA, Huberman E.** A sensitive hepatocyte-mediated assay for the metabolism of nitrosamines to mutagens for mammalian cells. *Cancer Res*, 1980;40: 406-410.
149. **McCoy GD, Chen CB, Hecht SS, McCoy EC.** Enhanced metabolism and mutagenesis of nitrosopyrrolidine in liver fractions isolated from chronic ethanol-consuming hamsters. *Cancer Res*, 1979; 39: 793-796.
150. **Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimura T.** A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. En: de Serres FJ, Fouts JR, Bend JR, Philpot RM. *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. Elsevier, Amsterdam, 1976; 85-88.
151. **Thompson, ED.** Comparison of *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assay results. *Environ Mutagen*, 1986; 8: 753-767.
152. **Ishikawa T et al.** *In vivo* experiments on tryptophan pyrolysis products. En: Miller JA, Miller EC, Sugimura T, Takayama S, Hirono I (Eds). *Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis*, 1979a; 159-165.
153. **Ishikawa T, Takayama S, Kitagawa T, Kawachi T, Sugimura T.** Induction of enzyme-altered islands in rat liver by tryptophan pyrolysis products. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1979b; 95:224-230.
154. **Rao TK, Young JA, Lijinsky W, Epler JL.** Mutagenicity of aliphatic nitrosamines in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*, 1979; 66: 1-7.

155. **Green MHL.** Mutagen Testing Using Tpr⁺ Reversion in *Escherichia coli*. En: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C. (Eds). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 1984; 161-187.
156. **Loper JC.** Mutagenic Effects of Organic Compounds in Drinking Water. *Mutat Res* 1984; 76: 241-268.
157. **Chu K, Patel K, Lin A, Tarone R, Linhart M, Dunkel VC.** Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays. *Mutat Res*, 1981; 85: 119-132.
158. **Moriya M.** Turther mutagenicity studies and pesticides in bacterial reversion assay sistems. *Mutat Res*, 1983; 116: 185-216.
159. **Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC.** An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res*, 1982; 97:267-281.
160. **Weinstein D, Lewinson TM.** A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay. *Mutat Res* 1978; 51: 433-434.
161. **Haynes RM, Eckardt F.** Mathematical analysis of mutation induction kinetics. En: De Serres FJ et al. *Chemical Mutagens*, 1980; 271-307.
162. **Margolin BH, Kaplan N, Zeiper E.** Statistical analysis of Ames Salmonella/microsome test. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3779-3783.
163. **McCann J, Horn L, Kaldor J.** An Evaluation of *Salmonella* (Ames) test data in the published literature: Application of Statistical procedures and Analysis of mutagenic potency. *Mutat Res* 1984; 134: 1-47.

164. **De Greef E, Morris JC, van Kreijl CF, Morra CFH.** Health effects in the chemical oxidation of the polluted water. En: Jolley RL, Brungs WA, Cummings RB (Eds). *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science, Michigan, 1980; 3: 913-924.
165. **Stevens AA, Slocum CJ, Seeger DR, Robekc GC.** Chlorination of organics in drinking water. En: Jolley RL. (Eds). *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science, Michigan. 1978; 1: 77-104.
166. **Oliver BG.** Chlorinated non-volatile organics produced by the reaction of chlorine with humic materials. *Can Res* 1978; 11: 21-22.
167. **Loper JC, Schoeny RS, Tardiff RG.** Evaluation of organic extracts of drinking water by bacterial mutagenesis. *Mutat Res* 1978; 53: 223-224.
168. **Glatz BA, Chriswell CD, Arguello MD, Svec HJ, Fritz JS, Grimm SM, Thompson MA.** Examination of drinking water for mutagenicity activity. *J Am Wat Wks Ass* 1978; 70: 465-468.
169. **Nestmann ER, LeBel GL, Williams DT, Kowbel DJ.** Mutagenicity of organic extracts from Canadian drinking water in the Salmonella/ mammalian microsome assay. *Environ Mutagen* 1979; 1: 337-345.
170. **Heartlein MW, De Marini DM, Katz AJ, Means JC, Plewa MJ, Brockman HE.** Mutagenicity of municipal water obtained from an agricultural area. *Environ Mutagen* 1981; 3: 519-530.
171. **Kool HJ, van Kreijl CF, Hrubec J.** Mutagenic and Carcinogenic Properties of Drinking Water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher, 1984; 5: 187-205.
172. **Schwartz DJ, Saxena J, Kopfler FC.** Water distribution system, a new source of mutagens in drinking waters. *Environ Sci Technol*, 1979; 13: 1138-1141.

173. **Clark RR, Johnston JB.** Influence of chlorination and the distribution system in a potable water supply, UILU-WRC-82-0168, Research Report No. 168.
174. **Simmon VF, Kauhanen K, Tardiff RG.** Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water. En: Scott B, Bridges BA, Sobels FH (Eds). *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier/North- Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977; 249-258.
175. **Goodman D.** Review of genotoxic activity of chemicals identified in drinking water, present at the *International Symposium of Health Effects of Drinking Water Disinfectants and Disinfectant By-Products*. Cincinnati, OH. April 21-24 April, 1981.
176. **Kronberg L, Vartianen T.** Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer E-2-chloro-3(dichloromethyl)-4-oxo-butenoic acid in chlorine-treated tap waters. *Mutat Res* 1988; 206: 177-182.
177. **Horth H, Fielding M, James HA, Thomas MJ, Gibson T, Wilcox P.** Production of Organic Chemicals and Mutagens During Chlorination of Amino Acids in Water. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher INC, 1987; 6: 107-124.
178. **Kronberg L, Christman RF.** Chemistry of mutagenic by-products of water chlorination. *Sci Total Environ* 1989; 81/82, 219-230.
179. **Tabor MW, Loper JC, Barone K.** Analytical Procedures for Fractionating Nonvolatile Mutagenic Components from Drinking Water Concentrates. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Ann. Arbor Science. 1980; 3: 899-912.

180. **Meier JR, Knohl RB, Merrick BA, Smallwood CL.** Importance of Glutathione in the In vitro Detoxification of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, an Important Mutagenic By-product of Water Chlorination. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Lewis Publisher, 1987b; 6: 159-170.
181. **Lawrence CE, Taylor PR, Trock BJ, Reilly AA.** Trihalomethanes in Drinking Water and Human Colorectal Cancer. *J Nat Cancer Inst*, 1984; 72: 563-568.
182. **Morris Rd, Audet AM, Angelillo IF, Chalmers TC, Mosteller F.** Chlorination, Chlorination by-products, and cancer: A Meta-analysis. *Am J Public Health*. 1992; 82: 955-963.
183. **Kanarek MS, Young TB.** Case control study of colon cancer and water chlorination/volatile organics in Wisconsin, paper presented at the Sixth Conference on Water Chlorination, Oak Ridge, TN, 1987; May 3-8.